

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO  
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ PASIVNÍHO VZORKOVÁNÍ PŘI ANALÝZE HORMONŮ V  
PITNÝCH VODÁCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARTINA REMEROVÁ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

## VYUŽITÍ PASIVNÍHO VZORKOVÁNÍ PŘI ANALÝZE HORMONŮ V PITNÝCH VODÁCH

APPLICATION OF PASSIVE SAMPLING FOR THE ANALYSIS OF HORMONES IN DRINKING  
WATER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARTINA REMEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0694/2012</b>	Akademický rok: <b>2012/2013</b>
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	<b>Bc. Martina Remerová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	<b>doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Využití pasivního vzorkování při analýze hormonů v pitných vodách

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na negativní dopady přítomnosti látek s hormonálními účinky na živé organismy a na možnosti jejich analytického stanovení ve vodách. V oblasti vzorkování věnujte zvláštní pozornost pasivním vzorkovačům.
2. Na základě poznatků z literární rešerše navrhnete a optimalizujete analytickou metodu použitelnou pro stanovení syntetických hormonů ve vodách, zejména pitných.
3. Optimalizovanou metodu použijte pro analýzu vzorků odebraných na zvolené úpravně pitných vod v rámci České republiky s využitím pasivních vzorkovačů a doplnkově též vzorků odebraných bodovými odběry.
4. Vyhodnoťte získané výsledky a porovnejte je s dosud publikovanými daty.

### Termín odevzdání diplomové práce: 15.5.2013

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Martina Remerová  
Student(ka)

-----  
doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na využití pasivního vzorkování při analýze hormonů v pitných vodách. V teoretické části práce jsou popsány vybrané pasivní vzorkovače a podrobněji je popsán vzorkovač typu POCIS. Další kapitola je věnována steroidním hormonům a vstupu estrogenních hormonů do životního prostředí. Práce obsahuje kapitoly zabývající se možnostmi stanovení hormonů ve vodách, se zaměřením na analýzu pitných a povrchových vod. V poslední kapitole teoretické části práce je přiblížena úprava vody, kde byly odebrány vzorky pro experimentální stanovení. Experimentální část práce je věnována popisu extrakce analytů a nastavení použitých přístrojů. V práci jsou uvedeny kalibrace pro jednotlivá stanovení hormonů. Výsledky stanovení pro každé odběrové místo jsou uspořádány do přehledné tabulky. Ve většině odběrových míst nebylo prokázáno zvýšené množství sledovaných estrogenů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

pasivní vzorkovače, POCIS, steroidní hormony, estrogeny, estrogenní hormony v životním prostředí, plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **ABSTRACT**

The thesis focuses on the use of passive sampling during an analysis of hormones in drinkable water. In the theoretical part there are described selected passive samplers and the sample of the type of POCIS is described at fuller length. The next chapter engages with steroid hormones and an input of estrogenic hormone into the environment. The thesis contains chapters dealing with possibilities of the determination of hormones in water. It is specialized on the analysis of drinkable and surface water. In the last chapter of the theoretical part there are introduced water works where samples for an experimental assessment were collected from. The experimental part of the thesis presents the specification of the extraction of analytes and an adjustment of used device. In the thesis there are specific calibrations for individual assessment of hormones. The results of the assessment for each collection point are ordered to a well-arranged table. Increased levels of targeted estrogens were not approved in most of sampling points.

## **KEYWORDS**

passive samplers, POCIS, steroid hormones, estrogens, estrogenic hormones in the environment, gas chromatography, high performance liquid chromatography, mass spectrometry

REMEROVÁ, Martina: *Využití pasivního vzorkování při analýze hormonů v pitných vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 83 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana fakulty.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za odbornou pomoc a cenné rady při zpracování této práce. Dále děkuji prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. a Ing. Josefu Kotlíkovi, CSc. za pomoc při přípravě a provedení experimentální části této práce.

## OBSAH

1 Úvod.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Pasivní vzorkovací techniky.....	8
2.2 Pasivní vzorkovače.....	8
2.2.1 Princip pasivních vzorkovačů .....	8
2.2.2 Bioznečištění, teplota, difúzní koeficient .....	10
2.2.3 Rovnovážné vzorkovače .....	10
2.2.3.1 SPME – Solid Phase MicroExctraton .....	11
2.2.3.2 SBSE – Stir Bar Sorptive Extraction.....	12
2.2.4 Integrativní vzorkovače.....	12
2.2.4.1 SPMD – Semi-Permeable Membrane Device.....	13
2.2.4.2 PISCES – Passive In-Situ Concentration Extraction Sampler .....	14
2.2.4.3 MESCO – Membrane Enclosed Sorptive Coating Sampler.....	14
2.2.4.4 ChemCatcher .....	15
2.2.4.5 DGT – Diffusive Gradient in Thin Films .....	16
2.2.4.6 Keramický dozimetr .....	16
2.2.4.7 POCIS – Polar Organic Chemical Integrative Sampler .....	16
2.3 Hormony.....	19
2.3.1 Steroidní hormony.....	20
2.3.1.1 Kortikoidy .....	20
2.3.1.2 Androgeny .....	22
2.3.1.3 Gestageny .....	23
2.3.1.4 Estrogeny.....	24
2.3.2 Vstup estrogenů do složek životního prostředí .....	27
2.3.2.1 Povrchové vody.....	28
2.3.2.2 Podzemní vody.....	28
2.3.2.3 Pitné vody.....	28
2.3.2.4 Půda a sedimenty.....	28
2.3.3 Účinky estrogenů na organismy .....	29
2.4 Metody izolace analytů ze vzorků.....	29
2.4.1 SPE – Solid Phase Extraction.....	29
2.5 Metody stanovení steroidních látek ve vodách .....	30
2.5.1 Plynová chromatografie (GC) .....	31
2.5.1.1 GC s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS) .....	31
2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	32
2.5.2.1 HPLC s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS) .....	32
2.5.2.2 Ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) s ultrafialovou detekcí (UV).....	37
2.6 Vybrané metody analýzy estrogenních látek .....	38
2.7 Technologické schéma úpravy .....	39
3 Experimentální část .....	40
3.1 Sledovaná matrice a odběr vzorků .....	40
3.2 Chemikálie a přístroje .....	40
3.3 Sledované analyty .....	41
3.4 Příprava standardů, izolace analytů.....	44
3.5 Analýza standardů a vzorků .....	44
3.5.1 Podmínky analýzy .....	45
4 Výsledky a Diskuze.....	46
4.1 Optimalizace podmínek analýzy .....	46

4.1.1 Optimalizace typu kolony .....	46
4.1.2 Optimalizace teploty kolony .....	46
4.1.3 Optimalizace mobilní fáze .....	46
4.1.4 Optimalizace gradientu mobilní fáze .....	46
4.2 Výtěžnost metody SPE .....	47
4.2.1 Výtěžnost estronu .....	47
4.2.2 Výtěžnost $\alpha$ -estradiolu .....	48
4.2.3 Výtěžnost $\beta$ -estradiolu .....	49
4.2.4 Výtěžnost estriolu .....	49
4.2.5 Výtěžnost ethinylestradiolu .....	50
4.2.6 Výtěžnost diethylstilbestrolu .....	51
4.2.7 Výtěžnost progesteronu .....	51
4.2.8 Výtěžnost norethindronu .....	52
4.3 Kalibrační závislosti pro vyhodnocení vzorkovačů POCIS .....	53
4.3.1 Kalibrační závislost estronu .....	53
4.3.2 Kalibrační závislost $\alpha$ -estradiolu .....	54
4.3.3 Kalibrační závislost $\beta$ -estradiolu .....	54
4.3.4 Kalibrační závislost estriolu .....	55
4.3.5 Kalibrační závislost ethinylestradiolu .....	55
4.3.6 Kalibrační závislost diethylstilbestrolu .....	56
4.3.7 Kalibrační závislost progesteronu .....	56
4.3.8 Kalibrační závislost norethindronu .....	57
4.4 Stanovení hormonů v reálných vzorcích .....	58
4.4.1 Surová voda .....	59
4.4.2 Před flotační linkou .....	60
4.4.3 Za flotační linkou .....	60
4.4.4 Pitná voda .....	60
5 Závěr .....	62
6 Seznam použité literatury .....	63
7 Seznam použitých zkratk a symbolů .....	72
8 Přílohy .....	73

# 1 ÚVOD

Léčiva jsou v 21. století významným zdrojem znečišťujícím životní prostředí, neboť jejich spotřeba rychle roste. Nejinak je tomu u hormonů. Ty se do přírody dostávají metabolickými procesy probíhajícími hlavně v tělech živočichů, ale i v rostlinách. Mezi významné skupiny hormonálních polutantů lze zařadit estrogény. Jedná se o skupinu ženských pohlavních hormonů, jež jsou produkovány hlavně vaječníky, mimo nich vznikají i v nadledvinách a v některých periferních tkáních.

Protože jsou tyto hormony přirozenou součástí živočišné říše, lze předpokládat, že se budou nacházet v různých částích životního prostředí a nebudou označovány jako kontaminanty. Takto lze ovšem smýšlet o přirozených estrogenech. Jako polutanty se v přírodě vyskytují synteticky připravené estrogény, jež jsou součástí hormonální antikoncepce, kterou užívá čím dál více žen.

Estrogény se metabolickými cestami dostávají do odpadních vod a na čistírnách jsou vystaveny působení bakterií. Avšak bakterie nedokáží estrogény zcela z vody odstranit, takže se - i když v menší míře - dostávají do recipientu. Byly publikovány výsledky výzkumů, které upozorňují na fakt, že pravděpodobně vlivem zvýšené koncentrace estrogenů ve vodách dochází k feminizaci samců ryb a obojživelníků. Tento problém může být fatální pro populace těchto živočichů a v širším měřítku může mít samozřejmě dopad i na ostatní živočichy, včetně člověka.

Proto je nezbytné sledovat tyto látky v přírodě a studovat jejich působení na složky životního prostředí. Výsledky takovýchto studií by měly být návrhy, jak účinně odstraňovat syntetické estrogény z odpadních vod a tím zabránit jejich šíření a negativnímu působení v přírodě.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Pasivní vzorkovací techniky

Pasivní vzorkování je metoda sloužící ke sledování polutantů v životním prostředí. Princip metody je založen na volném toku molekul analytů ze vzorkovaného do sběrného média umístěného ve vzorkovacím zařízení jako výsledek rozdílů chemických potenciálů analytů v obou médiích [1]. Volný tok molekul analytu z jednoho média do druhého pokračuje buď do ustálení rovnováhy v systému, nebo do ukončení vzorkování operátorem. Vzorkování probíhá bez potřeby dodávání energie zvenčí [2,3].

Při pasivním vzorkování dojde k izolaci analytu ze vzorkované matrice a k jeho současnému zakoncentrování, sníží se tak podstatně počet kroků při zpracování vzorku [3]. Nedochází ke vzorkování celkového obsahu polutantů v dané složce životního prostředí, ale tyto vzorkovače vzorkují pouze určitou jejich frakci; v ovzduší jsou to substance v plynném skupenství, ve vodě, v půdě a sedimentech pak biodostupná frakce. Důležitá je i selektivita vzorkovačů. Pro nepolární látky se využívá vzorkovačů typu SPMDs, polární látky se vzorkují nejčastěji vzorkovači POCIS, pro vzorkování iontů se využívá vzorkovače DGT.

Pasivní vzorkovače poskytují informace o průměrné úrovni znečištění během doby expozice, protože jsou málo citlivé na okamžité extrémní změny v koncentraci polutantů [4].

### 2.2 Pasivní vzorkovače

První pasivní vzorkovače byly využity pro vzorkování ovzduší, a to roku 1853 pro vzorkování přízemního ozonu v atmosféře pomocí papírků napuštěných jodidem draselným. Následoval vývoj pro vzorkování vodního prostředí. V této složce životního prostředí bylo poprvé pasivních vzorkovačů využito roku 1987, kdy byly vzorkovány perzistentní lipofilní polutanty [5,6]. V posledních desítkách let dochází k jejich uplatnění i při vzorkování půdy a sedimentů [1].

Mezi výhody pasivních vzorkovačů patří jejich jednoduchost, nízká cena, malé nároky na údržbu a instalaci, jednoduchá manipulace, nehluchost [3]. Mezi hlavní nevýhody se řadí především možnost ovlivnění vzorkované frakce polutantů [2,4]. Při vzorkování vody je též nutné mít na paměti, že informace získaná z pasivního vzorkovače nevystihuje celkový obsah sledovaných látek ve vzorkované fázi životního prostředí, ale pouze jeho biodostupný podíl [6].

#### 2.2.1 Princip pasivních vzorkovačů

Principem pasivního vzorkování je transport analytu ze vzorkovaného média do média sběrného, který se řídí zákony difúze.

Analyty jsou v zařízení zachyceny vhodným sorpčním médiem, známém jako sběrná fáze. Rozlišujeme dva typy vzorkovačů a to integrativní a rovnovážné. Integrativní vzorkovače se vyznačují velkou kapacitou sběrné fáze a polopropustnou membránou nebo difúzní bariérou, oddělující vzorkované médium od sběrné fáze. Rovnovážné typy vzorkovačů membránu ani difúzní bariéru nemají, vyznačují se tedy přímým kontaktem vzorkované fáze a sběrného

média a malou kapacitou sběrné fáze. Proces vzorkování je však u obou dvou typů podobný [2].

Během vzorkování dochází k molekulové difúzi, která je řízena Fickovými zákony [1,2]. Časová závislost koncentrace ve sběrné fázi pasivního vzorkovače na koncentraci ve složce životního prostředí, ve které probíhá vzorkování, může být popsána diferenciální rovnicí popisující příjem analytu sběrnou fází vzorkovače:

$$V_s \cdot \frac{dC_s}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_s, \quad (1)$$

integrací získáme rovnici prvního řádu:

$$C_s(t) = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}), \quad (2)$$

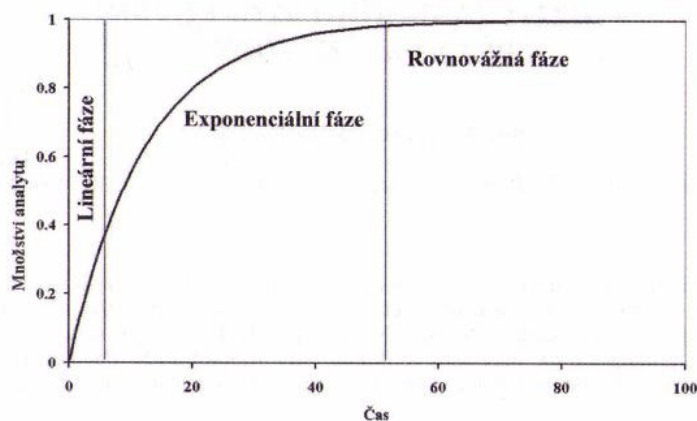
kde  $C_s(t)$  je koncentrace analytu ve sběrné fázi vzorkovače po čase expozice  $t$ ,  $C_w$  je koncentrace analytu ve vzorkované složce životního prostředí,  $k_1$  a  $k_2$  jsou rychlostní konstanty příjmu, respektive úniku polutantů [2]. Jejich poměr bývá označován jako rovnovážný rozdělovací koeficient mezi vzorkovačem a vzorkovaným médiem. Samotné rychlostní konstanty jsou vypočítány podle následujících vzorců:

$$k_1 = \frac{1}{\frac{\delta_w}{D_w} \cdot \frac{r}{\delta_w + r} + \frac{\delta_s}{D_s \cdot K_{sw}}} \cdot \frac{A_s}{V_s} \quad (3)$$

$$k_2 = \frac{1}{\frac{\delta_w}{D_w} \cdot \frac{r}{\delta_w + r} \cdot K_{sw} + \frac{\delta_s}{D_s}} \cdot \frac{A_s}{V_s}, \quad (4)$$

kde  $\delta$  je tloušťka hraniční vrstvy (m),  $D$  je difúzní koeficient ( $m^2 \cdot d^{-1}$ ), indexy S a W reprezentují sběrnou fázi vzorkovače, respektive vodu,  $r$  je poloměr zakřivení povrchu vzorkovače a  $A_s$  je plocha povrchu vzorkovače ( $m^2$ ) [7].

Existují dva základní režimy pasivních vzorkovačů – rovnovážný a integrativní. U obou typů vzorkovačů dochází ke zpětnému úniku analytů, ovšem u integrativních vzorkovačů je únik nepatrný, tudíž ho lze zanedbat [8].



Obr. 1: Závislost množství analytu ve sběrné fázi pasivního vzorkovače na čase [6]

### 2.2.2 Bioznečištění, teplota, difúzní koeficient

Na pasivní vzorkování za použití integrativních vzorkovačů má vliv několik faktorů. Prvním z nich je tvorba biofilmu. Nechráněné plochy pasivních vzorkovačů ponořené do vzorkovaného média mohou být po čase kolonizovány florou daného prostředí a na jejich povrchu vzniká vrstva biofilmu. Jeho složení se liší v závislosti na složení vzorkované fáze. Vznik biofilmu snižuje rychlost příjmu polutantů, protože vzniklá bariéra zpomaluje přechod vzorkovaného média do vzorkovače. Může dojít i k nevratnému poškození vzorkovače. Tento problém může být odstraněn výběrem vhodné membrány. Bylo zjištěno, že například polyethersulfonové membrány jsou méně náchylné k poškození, než polyethylenové membrány. Kromě toho zařízení, které jsou naplněna rozpouštědlem, mohou uvolňovat během expozice malé množství rozpouštědla do vzorkovaného média, což zabraňuje vzniku biofilmu [2].

Dalším faktorem je teplota. Ta je velmi důležitá při validaci vzorkování a pro určení rychlosti příjmu vzorkovače. Teplotní závislost propustnosti skrze polymery je určována difúzním koeficientem molekuly v polymeru a rozpustností molekuly v polymeru. Rozpustnost a přenosové vlastnosti molekuly mohou být vyjádřeny jako funkce teploty použitím Van't Hoffovy a Arrheniovy rovnice:

$$S = S_0 \exp\left(-\frac{H_s}{RT}\right) \quad (5)$$

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right) \quad (6)$$

$$P = P_0 \exp\left(-\frac{E_p}{RT}\right), \quad (7)$$

kde  $S_0$  je koeficient standardní rozpustnosti,  $D_0$  je difúzní koeficient a  $P_0$  je koeficient propustnosti.  $H_s$  je koeficient sorpčního tepla,  $E_d$ ,  $E_p$  jsou koeficienty aktivační energie pro difúzi, respektive pro propustnost. Kombinací rovnic získáme rovnici aktivační energie propustnosti:

$$E_p = E_d + H_s \quad (8)$$

Bylo zjištěno, že pro určité druhy membrán (například polydimethylsiloxanové membrány) jejich propustnost klesá s rostoucí teplotou. Naopak pro jiné druhy membrán, jako je polyethylenová membrána, jejich propustnost s rostoucí teplotou roste [1].

Difúzní koeficient molekuly jako faktor ovlivnění pasivního vzorkování je dobře popsán pro vzduch, kde je nepřímo úměrný tlaku. Pro vodné prostředí již detailní popis vlivu difúzního koeficientu není. Byla realizovaná studie, ve které byl použit vzorkovač SPMD s polyethylenovou semipermeabilní membránou pro vzorkování mořské vody v hloubce 5 km (tudíž pod velmi vysokým tlakem), a po roce ani po dvou letech nebyly se vzorkováním žádné problémy [1].

### 2.2.3 Rovnovážné vzorkovače

Pro využití tohoto typu vzorkovače je třeba znát hodnotu rozdělovacího koeficientu vzorkovač/vzorkované médium [9]. Analyty jsou ze vzorku zachyceny sorpčním médiem přímo, nemusí překonávat během transportu žádnou bariéru [8]. U těchto vzorkovačů dochází

k vytvoření termodynamické rovnováhy mezi vzorkovanou a sběrnou fází. Vzhledem k malé kapacitě sběrné fáze je této rovnováhy dosahováno poměrně rychle a doba expozice se pohybuje v řádech od několika minut do několika hodin [3,8].

Dosažená rovnováha je pak charakterizována vyrovnaním rychlosti příjmu polutantů vzorkovačem a jejich úniku zpět do prostředí. V této situaci se exponenciální člen rovnice (2) blíží nule a rovnice se redukuje na tvar:

$$C_s = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} = C_w \cdot K, \quad (9)$$

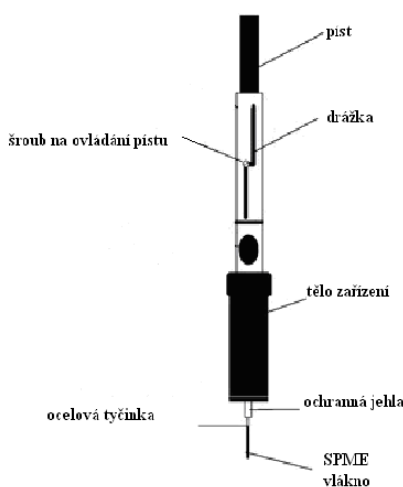
kde  $K$  je rozdělovací koeficient analytu mezi vzorkovanou a sběrnou fází. Jeho znalost umožňuje na základně množství zachycených polutantů vypočítat jejich koncentrace ve vzorkovaném médiu. Využití rovnovážných vzorkovačů není příliš vhodné pro získání průměrných koncentrací za delší časové období [8]. Mezi zástupce rovnovážných vzorkovačů patří SPME, SBSE [2].

### 2.2.3.1 SPME – Solid Phase MicroExtraction

V českém překladu se jedná o mikroextrakci pevnou fází. Tato metoda byla poprvé popsána roku 1989 [10]. Zařízení pracuje bez použití organického rozpouštědla, proto je tato technika jednoduchá, praktická, ekonomická a šetrná k životnímu prostředí. V jednom kroku dochází k extrakci i ke zkoncentrování analytu [1]. Sorpčním médiem je tenká vrstva polymeru nanesená na optickém křemenném vlákne. Vzorkovaný analyt je sorbován v této vrstvě polymeru [10].

Sorpční vlákno je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v ochranné duté ocelové jehle. Touto jehlou se propíchne septum v uzávěru vialky se vzorkem a posunutím pístu se vlákno vysune do kapalného vzorku, případně do plynné fáze nad jeho hladinou. Analyt se poté sorbuje do vrstvy pokrývající vlákno. Po dosažení sorpční rovnováhy se vlákno opět zasune dovnitř jehly a spolu s ní je vytaženo z nádoby se vzorkem [1,8].

Metoda patří mezi standardní postupy přípravy vzorku pro plynovou chromatografii, protože – jak již bylo řečeno – nevyžaduje použití rozpouštědla. V současné době se využívá i spojení SPME s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií [11].

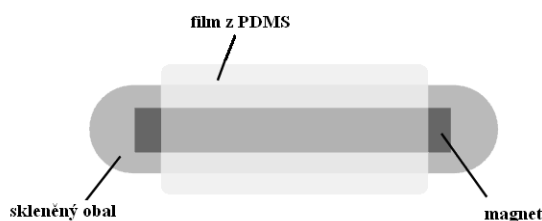


Obr. 2: Zařízení SPME [12]

Tato technika je široce použitelná pro vzorkování vzduchu, vodního prostředí, ale i pro vzorkování půdy. Může pracovat ve dvou módech: přímé vzorkování a vzorkování rovnovážné plynné fáze (headspace). Přímé vzorkování probíhá vložení vlákna do vzorkovaného média. V módu headspace se umístí vlákno SPME do prostoru nad pevným nebo kapalným vzorkem, který je ve vialce. Analyty se ze vzorkované matrice uvolňují do plynné fáze nad ní a odtud jsou sorbovány na vlákno. K rozdělení molekul mezi plynnou vrstvu a vlákno dochází na základě rozdílné afinity organické složky v daných fázích [1,8]. Vzorkovač se využívá v různých oblastech životního prostředí.

### 2.2.3.2 SBSE – Stir Bar Sorptive Extraction

Vzorkovač na obrázku č. 3 byl v podstatě určen ke stejnému účelu jako vzorkovač SPME. Jedná se o sorpční extrakci, která ale probíhá při míchání. Zařízení má tvar magnetického míchadélka. Uvnitř skleněného obalu je magnet. Skleněný obal je pokrytý vrstvou polymeru – polydimethylsiloxanu, který slouží jako sběrná fáze [13]. Tento vzorkovač se využívá pro různé druhy látek, podobně jako vzorkovač SPME. Mimo jiné byl úspěšně využit při vzorkování alkylfenolů, ftalátů a hormonů v odpadní vodě a v kalech na čistírně odpadních vod v Austrálii [14].



Obr. 3: Vzorkovač SBSE [15]

### 2.2.4 Integrativní vzorkovače

Integrativní vzorkovače na rozdíl od rovnovážných využívají bariéru oddělující vzorkované a sběrné médium (polopropustnou membránu nebo difúzní bariéru), a vyznačují se velkou kapacitou sběrné fáze [6,8]. Předpokládá se, že míra přenosu hmoty na sorpční médium je lineárně úměrná rozdílu mezi chemickým potenciálem polutantu ve vzorkované fázi a na sorpčním médiu [3,4].

V době odběru vzorků nedochází jako v předchozím případě k ustálení rovnováhy s okolním prostředím. Vzorkovač pracuje v lineárním režimu, zanedbává se zpětný únik do prostředí a rovnice (1) se mění na:

$$\frac{dM_s}{dt} = V_s \cdot \frac{dC_s}{dt} = k_1 \cdot C_w \quad (10)$$

Po integraci s počátečními podmínkami  $C_s = 0$  v čase  $t = 0$  pak získáme vztah:

$$M_s(t) = k_1 \int_0^t C_w dt \quad (11)$$

Integrál koncentrace sledované látky ve vzorkovaném médiu po dobu expozice vzorkovače v podstatě představuje průměrnou koncentraci této látky během tohoto období:

$$M_s(t) = k_1 \cdot \overline{C_w} \cdot t \quad (12)$$

kde  $\overline{C_w}$  je průměrná (časově vážená) koncentrace vzorkovaného analytu ve vzorkovaném médiu po dobu expozice.

Tento vztah se obvykle uvádí ve tvaru

$$M_s(t) = C_w \cdot R_s \cdot t, \quad (13)$$

kde  $M_s(t)$  je hmotnost zachyceného analytu v sorpčním médiu po uplynutí doby expozice  $t$  a  $R_s$  je označována jako vzorkovací rychlost a lze ji definovat následovně [2]:

$$R_s = k_1 \cdot V_s = K_{sw} \cdot k_2 \cdot V_s, \quad (14)$$

kde  $V_s$  je objem sběrné fáze vzorkovače.

Vlivem rozdílných chemických potenciálů vzorkované sloučeniny mezi vzorkovaným prostředím a sběrnou fází pasivního vzorkovače sledovaná látka difunduje k povrchu sorbujícího materiálu, kde je zachycena buď na základě chemické reakce, nebo fyzikální adsorpce. Látky jsou po ukončení expozice ze sběrné fáze uvolněny a následně stanoveny nejčastěji separačními technikami ve spojení s hmotnostní detekcí [8].

Mezi integrativní vzorkovače řadíme například SPMD, PISCES, MESCO, Chemcatcher, Keramický dozimetr, POCIS [6]. Tyto vzorkovače slouží pro vzorkování organických polutantů ve vodním prostředí. Pro vzorkování anorganických polutantů se využívají například Chemcatcher, DGT. V následujícím textu bude popsán vzhled a použití všech těchto zařízení.

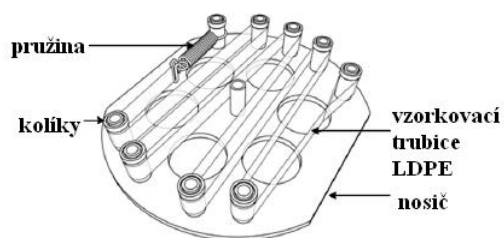
#### **2.2.4.1 SPMD – Semi-Permeable Membrane Device**

Jedná se o vzorkovací zařízení s polopropustnou membránou. Poprvé bylo použito roku 1990 pro studium biologické dostupnosti hydrofobních organických polutantů ve vodním systému [16]. V současnosti má mnohem větší uplatnění. V literatuře bývá tento typ vzorkovače označován též jako „virtuální ryba“, protože simuluje akumulární schopnosti vodních organismů [1,6].

Skládá se z polyethylenové ploché trubice uzavřené na obou koncích a naplněné trioleinem. Membrána i sběrné médium jsou hydrofobní. Zařízení může být použito pouze pro hydrofobní kontaminanty, které mají  $\log K_{ow}$  větší než 3 [1]. Skrze polyethylen prostupují pouze rozpuštěné a neionizované kontaminanty a ty mohou být vzorkovány [2].

Po vzorkování přichází na řadu uvolnění zachycených látek nejčastěji použitím dialýzy v rozpouštědle (zpravidla n-hexan); po přečištění a případné skupinové frakcionaci dialyzátu pak následuje vhodná analytická koncovka.

Vzorkují se tak ve vodním prostředí např. polychlorované bifenyly, polycyklické aromatické uhlovodíky, organochlorované pesticidy, polychlorované dibenzo-p-dioxiny a furany [1,2]. V současné době je tento typ vzorkovače využíván nejvíce a je též vhodným nástrojem pro posouzení toxicity dané matrice [17].

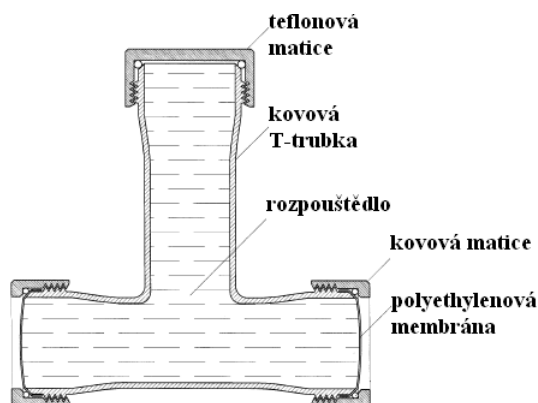


Obr. 4: a) Vzorkovač SPMD [1]

#### 2.2.4.2 PISCES – Passive In-Situ Concentration Extraction Sampler

Vzorkovač PISCES byl poprvé prezentován roku 1993 [18]. Vzorkovač je tvořen kovovou trubicou tvaru T, ve které je rozpouštědlo. Na koncích trubky jsou uzávěry, které zabraňují vytečení rozpouštědla. Rozpuštěné analyty překonávají bariéru ve formě polyethylenové membrány a difúzí se dostávají z vody do rozpouštědla [3,4].

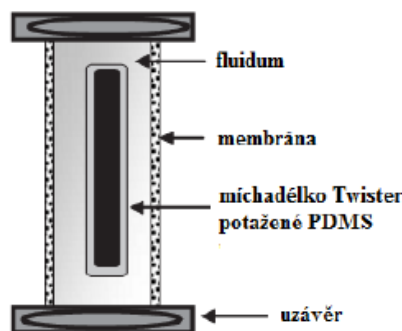
Jako rozpouštědlo se v tomto vzorkovači používá nejčastěji hexan, ale mohou být využita i jiná nízkomolekulární organická rozpouštědla. V průběhu expozice dochází k nasáknutí membrány rozpouštědlem a tím je zabráněno vzniku biopokryvu [6]. Využívá se pro stanovení například polychlorovaných bifenyků nebo pesticidů [19].



Obr. 5: Vzorkovač PISCES [20]

#### 2.2.4.3 MESCO – Membrane Enclosed Sorptive Coating Sampler

Poprvé byl vzorkovač popsán v roce 2001 [21]. V podstatě se jedná o vzorkovač SBSE uzavřený do obalu ze semipermeabilní membrány [22]. Z rovnovážného vzorkovače se tímto krokem stane vzorkovač integrativní. První prototyp vzorkovače byl použit pro monitorování nepolárních látek ve vodném prostředí [23]. Následoval typ označovaný jako MESCO I, kde jako sběrná fáze bylo použito míchadélko Twister pokryté vrstvou PDMS [24]. Poslední typ označený jako MESCO II se vyznačuje vysokou kapacitou přijímací fáze a nahrazením míchadélka Twister silikonovou tyčinkou [25].

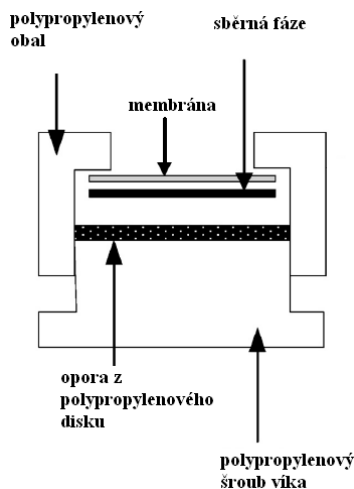


Obr. 6: Vzorkovač MESCO [21]

#### 2.2.4.4 ChemCatcher

Tento systém byl vyvinut na Univerzitě v Portsmouthu [26]. Používá se pro vzorkování polycyklických aromatických uhlovodíků, polychlorovaných bifenylovů, organochlorových pesticidů, reziduí léčiv z vodního prostředí [1,6]. Vzorkovač je tvořen inertním plastovým pouzdrem, ve kterém je umístěna difúzní membrána a sběrné médium. Jako sběrného média pro hydrofobní organické polutanty se využívá Empore disků  $C_{18}$ , které jsou dodávány pro extrakci tuhou fází. Sběrné médium je uchyceno ve vzorkovači a překryto difúzní membránou [6].

Podle toho jaké látky chceme vzorkovat, volíme materiál membrány i různé typy sběrné fáze. Například polyethylenovou membránu použije při vzorkování nepolárních látek, naopak polyethersulfonovou membránu použijeme při vzorkování polárních látek [1,27].



Obr. 7: Vzorkovač Chemcatcher [1]

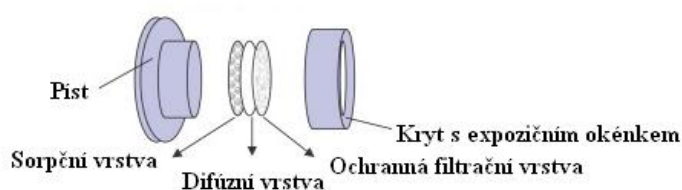
V alternativní konfiguraci se dá tento vzorkovač využít i pro vzorkování kationtů kovů z vodného prostředí, např. Cd, Cu, Ni, Pd a Zn. Zařízení pro toto použití využívá difúzní membrány z acetátu celulózy a sběrné chelatační membrány, které jsou ve formě disku o průměru 47 mm [2,6]. Difúzní membrána může být ošetřena povlakem například polymeru polyfluoridové sulfonové kyseliny, který snižuje biologické znečištění povrchu membrány [2]. Takovýto vzorkovač byl například použit pro vzorkování vody v rybnících a získané výsledky byly porovnány s průměrnými koncentracemi kationtů kovů získaných z týchž rybníků z bodových vzorků. Výsledky ukázaly dobrou shodu obou metod



u sledovaných kationtů kovů. Nejlépe se výsledky shodovaly u mědi, větší rozdíly v hodnotách výsledků obou zařízení byly pozorovány u zinku [2].

#### 2.2.4.5 DGT – Diffusive Gradient in Thin Films

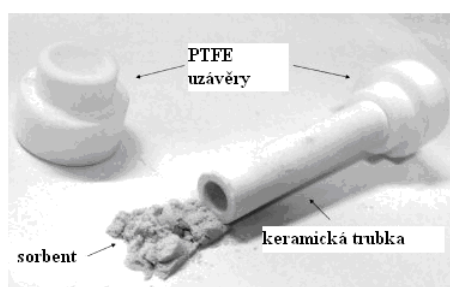
Tento typ vzorkovače byl poprvé popsán roku 1994 a byl využit pro vzorkování kationtů zinku v mořské vodě [28]. Zařízení se skládá z pístu, na jehož vrcholu jsou dvě vrstvy hydrogelu – sorpční a difúzní. Obě vrstvy jsou překryty krytem. V krytu je expoziční okénko s membránovým filtrem, který chrání difúzní gel před poškozením [6]. Jako sorpční gel se nejčastěji využívá iontoměnič Chelex-100 s iminodiacetátovými funkčními skupinami. Jako difúzní gel se nejčastěji využívá polyakrylamidový gel s určitou velikostí pórů určující jeho selektivitu. Ionty projdou difúzním gelem a jsou imobilizovány na funkčních skupinách sorpčního gelu, a to tak dlouho, až dojde k nasycení jeho kapacity [2,6].



Obr. 8: Vzorkovač DGT [29]

#### 2.2.4.6 Keramický dozimetr

Dozimetr jako pasivní vzorkovač není u nás příliš rozšířen a používán [30]. Vzorkovač je tvořen keramickou trubičkou, jež je na obou koncích uzavřena víčkem z polytetrafluorethylenu. V trubičce je umístěn sorbent. Tloušťka stěny trubičky určuje tzv. difúzní vzdálenost, která se dá exaktně matematicky popsat. Analyty jsou akumulovány difúzí přes porézní stěny trubičky do sorbentu. Po expozici je sorbent vyjmut z dozimetru a je extrahován organickým rozpouštědlem, obvykle acetonem [1,31]. Následuje analytická koncovka. Zařízení se využívá ke vzorkování ovzduší, ale i pro vzorkování vod, např. polycyklických aromatických uhlovodíků v podzemních vodách.



Obr. 9: Keramický dozimetr [32]

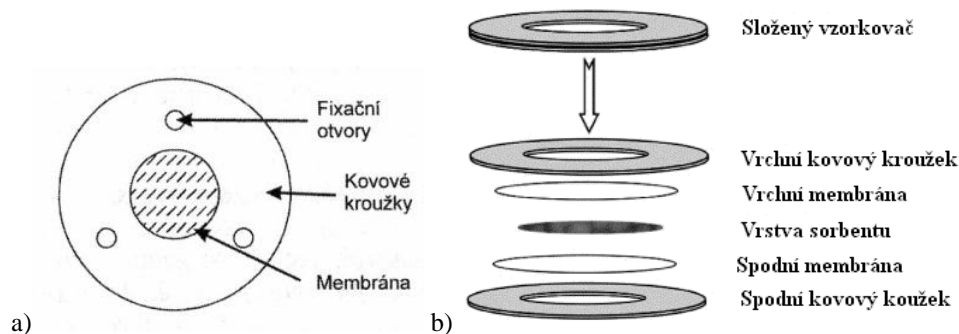
#### 2.2.4.7 POCIS – Polar Organic Chemical Integrative Sampler

V češtině se označuje jako integrativní vzorkovač pro vzorkování polárních organických látek, což mohou být pesticidy, léky, steroidy, hormony, atd. Tyto sloučeniny vstupují do vod v celosvětovém měřítku a mohou být příčinou chronické toxicity pro ekosystémy [2].

Vzorkovač se využívá pro vzorkování vodních systémů. Byl navržen jako doplněk k SPMD [1]. Patentován byl roku 2002 [33].

## Popis

Základem je sorbent, který se vybírá podle stanovované látky. Je uzavřen mezi dvěma mikroporézními polyethersulfonovými membránami a celý systém je dohromady držen šrouby ve fixačních otvorech kovových kroužků [6].



Obr. 10: Vzorkovač POCIS: a) komplet [6]; b) rozložený [34]

Typ sorbentu se může měnit v závislosti na vzorkovaném analytu. Existují dva hlavní typy:

- 1) konfigurace pro všeobecné použití: zařízení obsahuje směs tří druhů sorbentů
- 2) konfigurace pro léčiva; zařízení obsahuje sorbent Oasis HLB

Sorbent pro všeobecné použití složený ze tří druhů obsahuje směs adsorbentu Isolute ENV+, což je hydroxylovaný kopolymer polystyrenu a divinylbenzenu, a adsorbentu Amborsorb 1 500 na polymerním nosiči Bio Beads SX-3 [34,35].

Verze pro léčiva má pouze jeden sorbent z toho důvodu, že léčiva obsahují více funkčních skupin, které se vážou na třífázový systém, a tato vazba nedovoluje jejich eluci ze sorbentu. Oasis HLB je kopolymerní styren-divinylbenzenová pryskyřice, která velmi dobře sorbuje právě tento typ analytů a nedochází u ní k výše popsaným komplikacím [2].

## Vzorkované sloučeniny

Vzorkovače POCIS byly vyvinuty pro vzorkování polárních látek z vodního prostředí, jejichž logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol – voda ( $\log K_{ow}$ ) je menší než 4. Není to ovšem striktní pravidlo, tímto vzorkovačem se dají vzorkovat i látky s vyšší hodnotou tohoto koeficientu. Avšak vzorkovače POCIS nemají v tomto směru velké využití, neboť přímo pro tyto látky jsou určeny jiné typy vzorkovačů - např. SPMD [35].

Spektrum vzorkovaných sloučenin je rozsáhlé, od pesticidů po léčiva, hormony, steroidy, aj. V následující tabulce jsou příklady některých pesticidů a léčiv vzorkovaných pomocí POCIS.

**Tabulka 1: Příklady vzorkovaných pesticidů a léčiv [34]**

Pesticidy			Léčiva
Imazethapyr	Fipronil	Metribuzin	Sulfapyridin
Thifensulfuron-methyl	Kresoxim-methyl	Desethylatrazin	Sulfamethazin
Methamidophos	Phosalone	Diazinon	Sulfamethoxypyridazin
Nicosulfuron	Metaxyl	Atrazin	Sulfachloropyridazin
Rimsulfuron	Dichlobenil	Terbuthylazin	Sulfamethoxazol
Dimethoat	Phorate	Simazin	Diaveridin
Metoxuron	Propyzamid	Desmetryn	Trimetoprim
Phosphamidon	Triallat	Prometryn	Carbamazepin
Thiophanate-methyl	Carbofuran	Terbutryn	Diclofenac
Monolinuron	Acetochlor	Cyanazin	Metronidazol
Chlorotoluron	Alachlor	Metamitron	Cefalexin
Isoproturon	Metolachlor	Hexazinon	Ofloxacin
Metobromuron	Bromacil	Clopyralid	Norfloxacin
Methabenzthiazuron	Fluazifop-butyl	Dicamba	Ciprofloxacin
Diuron	Propiconazol	Bentazon	Enrofloxacin
Methidathion	Tebuconazol	Bromoxynil	Demeclocyclin
Azoxystrobin	Fenhexamid	2,4-D	Doxycyclin
Linuron	Fenarimol	MCPA	Erythromycin
Chlorbromuron	2,4,5-T	Dichlorprop	
		MCPP_MECOPROP	

Vzorkovač POCIS zachytává i některé průmyslově vyráběné látky, např. indol nebo DEET (N, N-diethyl-m-toluamid) [3].

### Použití vzorkovače

Aby se mohly sledované polární analyty akumulovat v sorbentu, musí překonat selektivní membránu. Její póry mají velikost kolem 100 nm, čili molekuly větší velikosti nejsou membránou propuštěny. Doba expozice je minimálně čtyři týdny. Jednotlivé vzorkovače jsou přichyceny šrouby na kovový nosič a ten je zasazen do kovového koše. Celý systém je umístěn do místa vzorkování a fixován zde vhodným způsobem. Po ukončení vzorkování je systém přenesen do laboratoře, kde je rozebrán a zachycené látky jsou ze sběrné fáze extrahovány a analyzovány. Jako extrakce se využívá buď vysokotlaká extrakce rozpouštědlem, nebo sonikace. Získaný extrakt je analyzován nejčastěji plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí [3,35].



a)



b)

**Obr. 11: a) Nosič disků POCIS [36]; b) Vzorkovače POCIS na nosiči umístěném v koši [37]**

## 2.3 Hormony

Hormony jsou definovány jako vysoce specializované látky, produkované endokrinními žlázami nebo specializovanými buňkami, působící na cílové buňky, které jsou specifické. Tato vlastnost cílových buněk je dána přítomností receptorů, na něž se hormony vážou. Vzniká tak komplex hormon-receptor, jenž spouští biologickou odpověď charakteristickou pro danou cílovou buňku. Tvorba komplexu závisí na koncentraci hormonu a afinitě receptoru. Hormony se podílejí na růstu, vývoji, na využití živin a tvorbě zásob, řídí trávení, metabolismus iontů a vody a v neposlední řadě reprodukci.

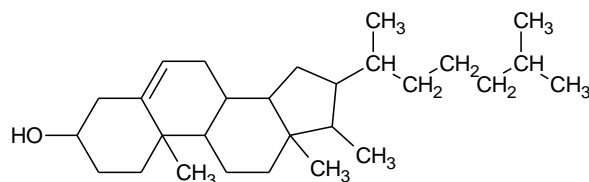
Hormony jsou tedy látky přírodní, ovšem moderní farmakologie takto označuje i látky, které jsou uměle připravovány a mají stejné účinky [38].

Název hormony je odvozen od řeckého slova hormao, což znamená pobízet, pohánět. Zavedli jej W. M. Bayliss a E. H. Starling v roce 1905 [39].

Historie izolace jednotlivých hormonů začíná již v roce 1901, kdy prvním izolovaným hormonem v čistém stavu byl adrenalin. Jeho izolace probíhala z dřene nadledvin a krátce na to byl připraven i synteticky. Dalším hormonem byl thyroxin, který byl izolován v krystalickém stavu ze štítné žlázy v roce 1914. Jeho struktura byla ovšem objasněna až o 12 let později a brzy na to byl připraven i synteticky. Obou úspěšných pokusů přípravy hormonů bylo využito roku 1921, kdy F. G. Banting a C. H. Best připravili poprvé v surovém stavu insulin, což je hormon slinivky břišní, a učinili tak převratný krok v léčbě doposud smrtelné cukrovky. Tato práce byla o dva roky později odměněna udělením Nobelovy ceny. Následovaly izolace estrogenních hormonů, nikoliv však z vaječníků, kde jsou tyto hormony produkovány, ale z moče těhotných žen. Čistý estrogenní hormon byl izolován roku 1929. Nezávisle na sobě na této izolaci pracovali dva vědci E. A. Doisy a A. Butenandt, který se také zabýval mužskými hormony a roku 1931 izoloval z mužské moče látku, kterou nazval androsteron. Ten se ukázal být metabolitem testosteronu, který izoloval z býčích varlat E. Laquer roku 1935. Jako steroidní hormony byly identifikovány i hormony izolované z kůry nadledvin, později nazvané jako kortikoidy [40].

Hormony lze rozdělit do několika skupin podle různých kritérií. Dělením podle chemické struktury získáme následující skupiny:

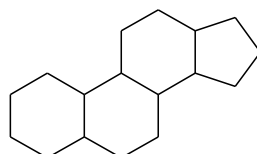
- a) hormony peptidové – ty jsou vylučovány do krevního řečiště a vážou se na membránové receptory cílových buněk. Jsou poměrně dobře odbouratelné v životním prostředí. Mezi zástupce patří například insulin.
- b) hormony odvozené od mastných kyselin – tkáňové hormony syntetizované z kyseliny arachidonové.
- c) hormony odvozené od aminokyselin - jsou to hormony odvozené zejména od thyrosinu (hormon štítné žlázy). Vážou se na receptory na povrchu buněk.
- d) hormony steroidní – v cílové buňce stimulují syntézu bílkovin, jsou lipofilní. Vážou se na specifické bílkovinné receptory uvnitř buněk. Výchozí látkou pro jejich syntézu je cholesterol [41].



**Obr. 12: Cholesterol**

### 2.3.1 Steroidní hormony

Steroidní hormony se v těle produkují v kůře nadledvin, ve varlatech a ve vaječnících. Základní kostrou pro odvození všech steroidů je cyklopentanoperhydrofenantrenový skelet, neboli gonan [42].

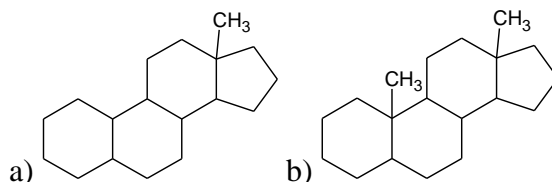


**Obr. 13: Gonan**

Výchozí látkou pro biosyntézu steroidních hormonů je cholesterol. Jeho zdrojem jsou zásoby tuků v buňce, nebo syntéza z acetylkoenzymu A, případně zdrojem cholesterolu mohou být lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), které jsou rozkládány nitrobuněčnými enzymy až na cholesterol. Protože jsou steroidní hormony povahy lipofilní, nemohou se v těle skladovat a plynule se tak uvolňují do extracelulárních tekutin [38].

Steroidní hormony se rozdělují do dvou skupin: kortikoidy a pohlavní hormony. Označení kortikoidy nesou hormony produkované kůrou nadledvin. Pohlavní hormony jsou tvořeny v mužských nebo v ženských pohlavních orgánech a jsou označovány jako androgeny, respektive estrogeny a gestageny [43].

Tyto hormony mají tedy strukturu odvozenou od gonanu jeho substitucí. Ta probíhá dvojí methylací na  $C_{(10)}$  a  $C_{(13)}$  nebo jednou methylací na  $C_{(17)}$  [39].



**Obr. 14: a) Estran; b) Androstan**

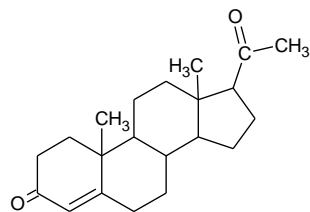
#### 2.3.1.1 Kortikoidy

Kortikoidy jsou látky nezbytné pro zachování života jedince, jejichž existence je známa již od 20. let minulého století. Jejich výzkum však byl značně složitější než u ostatních steroidních hormonů, neboť jejich funkce je o mnoho komplexnější [39,40].

Po chemické stránce patří kortikoidy do skupiny  $C(21)$ -uhlíkatých steroidů pregnanového typu. Jejich hlavní úlohou je ochrana organismu při zátěžových situacích. Zajišťují přísun glukózy do mozku, jehož činnost je na glukóze závislá, zajišťují krevní oběh a při zánětu nebo alergické reakci chrání organismus před nepříznivými důsledky [44].

Kortikoidy se dají dělit podle fyziologických funkcí na dvě skupiny: mineralokortikoidy a glukokortikoidy. Toto dělení je ovšem nutné chápat pouze přibližně, dle převládajícího

charakteru účinku, protože zvláště přírodní kortikoidy vykazují částečně obojí účinek. Prekurzorem obou skupin je progesteron [39].

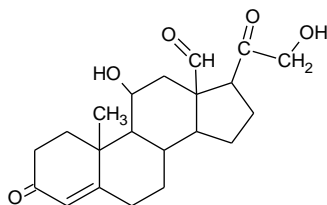


**Obr. 15: Progesteron**

Pro chemickou analýzu kortikoidů se využívá v současné době především chromatografických metod s vhodnými detektory, nejčastěji hmotnostními spektrometry. Dříve se hojně využívalo barevných reakcí, kolorimetrických nebo spektrofotometrických metod. S úspěchem se též setkalo stanovení pomocí elektromigračních metod [40].

### *Mineralkortikoidy*

Jsou odpovědné za elektrolytickou rovnováhu tím, že regulují transport a vylučování iontů sodných, draselných, chloridových a hydrogenkarbonátových a současně s tím regulují i distribuci vody v tkáních. Hlavním mineralkortikoidem je aldosteron [39,45].

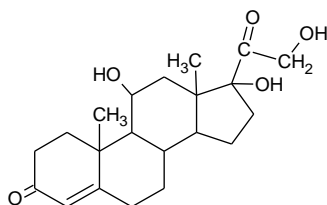


**Obr. 16: Aldosteron**

Hlavním podnětem pro tvorbu a sekreci aldosteronu je mimo jiné vzestup koncentrace draslíku v extracelulární tekutině. Takovéto zvýšení draselných iontů navozuje depolarizaci buněk v kůře nadledvin, což vede k otevření napěťově řízených kalciových kanálků. Po jejich otevření se zvýší intracelulární koncentrace kalciových iontů, která stimuluje tvorbu a sekreci aldosteronu [45].

### *Glukokortikoidy*

V organismu regulují metabolismus cukrů, tuků a bílkovin. Hlavní glukokortikoidem je kortizol.



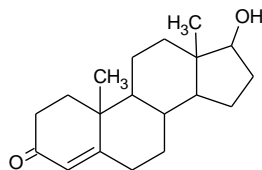
**Obr. 17: Kortizol**

V malých dávkách působí protizánětlivě, aktivují imunitní systém a blokují tvorbu protizánětlivých prostaglandinů. Tohoto poznatku se hojně využívá v medicínské praxi. Naopak při vysokých dávkách glukokortikoidů je aktivita imunitního systému potlačena, proto jsou takovéto léky podávány po transplantaci k zabránění odmítavé reakce imunitního

systému příjemce na transplantát. V organismu jsou též nezbytné pro zvládnutí stresových situací, kdy se jejich výdej významně zvyšuje [39,46].

### 2.3.1.2 Androgeny

Jako androgeny jsou označovány pohlavní hormony mužů řídící v prenatálním stádiu jedince vývoj a růst mužských pohlavních orgánů a v pubertě vznik sekundárních pohlavních znaků. Poprvé byly androgeny dokázány v lidském těle v roce 1927, avšak krystalický testosteron jako hlavní představitel této skupiny byl izolován až roku 1935. Ve stejné době byl tento hormon připraven i synteticky [39,40].



Obr. 18: Testosteron

Ačkoliv jsou androgeny mužské hormony, nacházejí se v malém množství i v ženském těle, stejně jako malé množství estrogenů a gestagenů se nachází v těle mužů. Androgeny ovlivňují v těle mnohem více reakcí než estrogeny a gestageny, zejména zasahují více do obecného metabolismu. Pro jejich široké působení se netvoří pouze ve varlatech, ale ve velké míře i v kůře nadledvin a u žen ve vaječnících. V organismu lze nalézt desítky androgenů a jejich derivátů, z nichž jen některé pocházejí z metabolismu testosteronu. Ostatní vznikají z kortikoidů nebo samostatnými cestami [43].

Jak je uvedeno výše, androgeny jsou sice pohlavní hormony, ale působí i na jiné reakce v těle. Například zvyšují retenci dusíku v těle, podporují syntézu bílkovin, také zvyšují retenci iontů draslíku, sodíku a vápníku, chloridů a vody, zasahují do metabolismu tuků a cukrů [47].

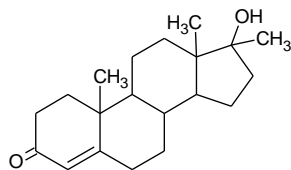
Existuje řada metod pro analytické stanovení androgenů. Dříve se využívalo ve značné míře kolorimetrického stanovení, byla použita i vážková metoda pro stanovení testosteronu. Pro stanovení methyltestosteronu přímo v tabletách bylo využito infračervené spektrometrie nebo spektrofotometrie v UV-oblasti. V současné době se hojně využívá chromatografických metod s vhodnou detekcí, nejčastěji hmotnostním spektrometrem [40].

### Testosteron

Testosteron - hlavní mužský pohlavní hormon - je derivátem androstanu. Tvoří jej Leydigovy intersticiální buňky a jeho produkci regulují hormony předního laloku hypofýzy prostřednictvím hypothalamu. Dospělý muž produkuje denně 7 mg testosteronu. V těle nedochází ke skladování testosteronu, ale z 98 % je vázán na specifický globulin, jehož koncentrace s věkem roste. Účinný je ale pouze volný testosteron, proto naopak koncentrace testosteronu s věkem klesá, ale jeho tvorba neustává. V mnoha tkáních je testosteron prohormonem, což znamená, že je to výchozí látka pro vznik účinného hormonu. Například 5- $\alpha$ -reduktáza vytváří biologicky 2 – 3x účinnější dihydrotestosteron. Dále například aromatáza v játrech, v tukové tkáni a v mozku mění testosteron na estradiol.

Testosteron je nevýhodný pro perorální podávání, neboť se v gastrointestinálním traktu špatně vstřebává, aplikuje se tedy transdermálně. Další možností jak tento problém odstranit

je substituce methylenem na C<sub>(17)</sub> za vzniku methyltestosteronu. Na rozdíl od testosteronu působí velmi dobře při perorálním podání, protože má v těle odlišný metabolismus [39,45].



Obr. 19: Methyltestosteron

K androgenům řadíme též anabolika, což jsou androgeny s vystupňovaným anabolickým efektem. Pod tímto pojmem rozumíme pozitivní dusíkovou bilanci jako důsledek vyšší produkce bílkovin a nukleových kyselin. Využívají se k podpoře syntézy bílkovin při těžkých onemocněních nebo k rekonvalescenci po nich. Anabolický efekt ale přetrvává pouze po dobu podávání anabolik. Je ovšem třeba mít na paměti nežádoucí účinky anabolik. U žen se může projevit prohloubení hlasu, u dětí při dlouhodobém užívání může být zpomalen růst a u mužů mohou způsobit snížení spermatogeneze. Zevním projevem užívání je obecně růst svaloviny a kostí. Tohoto využívají vrcholoví sportovci, ačkoliv anabolika podléhají předpisům o doping. Anabolika bývají rovněž využívána v živočišné výrobě ke zvýšení produkce masa [39,48].

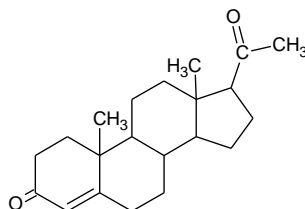
### 2.3.1.3 Gestageny

Jedná se o jednu ze dvou skupin ženských pohlavních hormonů. V těle jsou produkovány převážně žlutým tělískem a v graviditě placentou. Hlavním zástupcem skupiny je progesteron, který byl v extraktu ze žlutého tělíska prokázán roku 1928 [40,42].

Ve srovnání s druhou skupinou ženských pohlavních hormonů estrogy, mají gestageny mnohem širší uplatnění. Nacházejí se v řadě farmakologických produktů pro úpravu menstruačního cyklu, v terapii hormonálně podmíněných karcinomů, zejména rakoviny prsu, nejvíce se však uplatňují v antikoncepčních přípravcích [39].

#### Progesteron

Jeho hlavní funkcí v ženském těle je udržení těhotenství. Vedle toho působí relaxačně na hladké svalstvo, na centrální nervovou soustavu má tlumící účinek a ve vysokých dávkách působí anesteticky. Významný je i jeho vliv na termoregulaci. Biotransformace progesteronu probíhá v játrech, z těla se vylučuje převážně močí [49].



Obr. 20: Progesteron

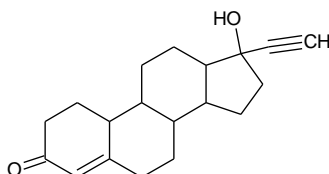
Mimo svoje hormonální účinky je i prekurzorem biosyntézy ostatních steroidních hormonů jako jsou estrogy ve vaječnících, androgeny ve varlatech a kortikoidy v nadledvinách. Jeho aplikace je značně omezena, neboť při perorálním podání je rychle metabolicky deaktivován. Proto stejně jako u androgenů i zde se využívá k aplikaci substituovaných derivátů [39].



Analyticky jej lze stanovit použitím spektrofotometrie, infračervené spektrometrie, ovšem v současné době je nejrozšířenější využití chromatografických metod s detekcí hmotnostním spektrometrem [50].

### *Norethindron*

Vyazuje některé účinky estrogenů i androgenů. Bývá aplikován orálně. Nejčastěji se používá jako náhrada progesteronu a v kombinaci s estrogenem je součástí hormonální antikoncepce [51].



**Obr. 21: Norethindron**

#### **2.3.1.4 Estrogeny**

Jedná se o druhou skupinu ženských pohlavních hormonů, jež jsou produkovány vaječníky. Mimo vaječníků vznikají estrogeny i v nadledvinách a v některých periferních tkáních, například v tukové tkáni. Estrogeny jsou nezbytné pro správný vývoj a činnost ženského reprodukčního systému a pro tvorbu sekundárních pohlavních znaků. Kromě toho ovlivňují vápníkový metabolismus při tvorbě kostí. Je nutné rozlišovat mezi dvěma pojmy, estrogeny a estrogenními hormony. První je pojmem širším a zahrnuje všechny látky s estrogenním účinkem, naopak druhý pojem je používán pro látky přírodní, ať izolované nebo synteticky připravené.

Chemicky lze přírodní estrogeny odvodit od estranu. V těle jsou hlavní tři – estradiol, estron a estriol. Roku 1927 byly zjištěny estrogenní hormony v moči těhotných žen a o dva roky později byl izolován první estrogenní hormon nazvaný estron. Krátce na to byl izolován další estrogenní hormon zvaný estriol. Fakt, že jsou tyto látky steroidními hormony, byl objasněn roku 1933. Jejich konečná struktura však byla popsána až roku 1935 a ve stejném roce byl poprvé z vaječníků izolován hormon estradiol [39,40,49].

Stejně jako u předchozích hormonů i estrogeny mají limitující faktory při perorálním podání, neboť jsou málo rozpustné, špatně se vstřebávají a rychle se odbourávají. Proto i pro ně existují polosyntetické deriváty, z nichž se na rozdíl od gestagenů prosadilo používání pouze dvou derivátů, a to ethinylestradiolu a jeho derivátu mestranolu.

Estrogenní aktivita však není výsadou jen steroidních sloučenin, naopak byla pozorována i u syntetických sloučenin nesteroidního charakteru. Největší pozornost byla věnována derivátům trans-stilbenu, jejichž hlavním představitelem je diethylstilbestrol. Estrogenní účinek se tady vysvětluje určitou podobností v prostorovém uspořádání terminálních hydroxylů s přírodním estradiolem. Estrogenní aktivita však není dominantou jen živočišné říše, byla pozorována i u rostlin, a to v celé řadě čeledí a v různých orgánech. V tomto případě hovoříme o fytoestrogenech [39,40].

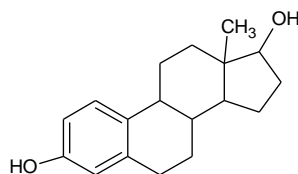
Analyticky je možné stanovit estrogeny několika způsoby. Nejstarší je stejně jako u ostatních steroidních hormonů kolorimetrie založená na tom, že estrogeny s kyselinou fenolsulfonovou dávají vínově červenou barvu. Dále se využívala absorpční spektrometrie

v UV oblasti, která vycházela z toho, že ve struktuře estrogenů je fenolové jádro, jež dává charakteristické absorpční spektrum. Pro některé sloučeniny bylo využito fluorimetrie. Tato metoda mohla být využita, protože některé steroidy v prostředí kyseliny sírové fluoreskují. V současné době je nejpoužívanější vhodná chromatografická metoda s detekcí hmotnostním spektrometrem [50].

### *Estradiol*

Je to hlavní estrogen dospělých žen, jeho denní produkce kolísá mezi 50 – 500 µg podle fáze cyklu. Tvoří se ve vaječnících a v těhotenství v placentě. Z daných tří hormonů je nejsilnější, neboť již v malých dávkách vyvolává intenzivní změny v cílových tkáních. Právě proto v organismu existuje několik mechanismů, které účinek estradiolu mírní, mění nebo zcela utlumí. Takovýmto mechanismem je oxidace, kdy z estradiolu vzniká estron, a oxidativní hydroxylace, kdy vzniká estriol. V lidském těle dochází k přeměně na estriol v játrech. Přeměna na estron probíhá zřejmě až v cílových tkáních.

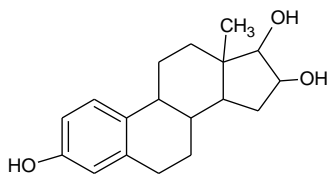
Estradiol bývá indikován pro substituční terapii z nedostatku estrogenů, což může být způsobeno přirozeně, úbytkem během menopauzy, nebo uměle po chirurgickém zákroku. Dále lze přípravky s estradiolem v kombinaci s gestageny použít k prevenci osteoporózy [39,41,49].



**Obr. 22: Estradiol**

### *Estriol*

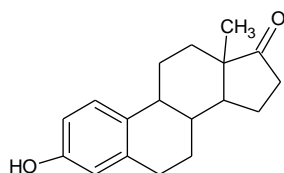
Je to hormon nacházející se přirozeně pouze v lidském těle. Vzniká ve velké míře v těhotenství. Jako metabolit estradiolu má pouze 1/10 jeho estrogení aktivity, a to proto, že došlo k oxidaci na šestnáctém uhlíku. Ovšem tento fakt hlavně způsobil nemožnost estriolu se zpětně měnit na estradiol, respektive estron. Estriol je tedy u člověka konečným oxidačním produktem estradiolu [42,49].



**Obr. 23: Estriol**

### *Estron*

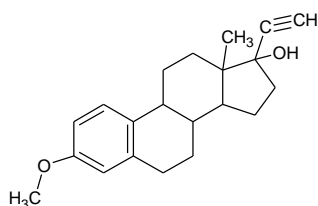
Byl prvním estrogenem se známou strukturou. Je hlavním hormonem u postmenopauzálních žen. Produkují jej přímo vaječníky, ale i kůra nadledvin. Oxidace probíhající na sedmnáctém uhlíku jej nezabavuje biologické aktivity, má asi polovinu až třetinu hormonální účinnosti estradiolu. Oxidací se vytvoří ketoskupina, která velmi dobře podléhá zpětné redukci, a tak se estron může měnit zpátky na estradiol [42,49].



**Obr. 24: Estron**

### *Ethinylestradiol*

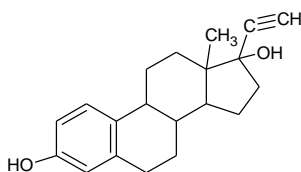
V současnosti je využíván jako složka perorálních hormonálních antikoncepčních přípravků. Postupně však bývá vytlačován přirozenými estrogeny, nejčastěji solemi estradiolu. Po aplikaci působí jako estradiol, je ovšem asi dvacetkrát silnější a je tedy pro člověka nejsilnějším známým estrogenem. Podobně se používal i jeho derivát mestranol [39,42,49].



**Obr. 25: Ethinylestradiol**

### *Mestranol*

Je derivátem ethinylestradiolu. Bývá aplikován při některých poruchách menstruačního cyklu a v menopauze. Též bývá součástí kombinovaných hormonálních antikoncepcí [51].

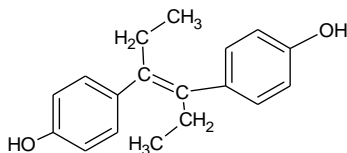


**Obr. 26: Mestranol**

### *Diethylstilbestrol*

Dnes již nepoužívaný estrogen, byl prvním synteticky připraveným. Nemá steroidní povahu, ale jeví estrogení účinky. Využíval se v minulém století k léčbě hrozícího potratu a dalších těhotenských komplikací. Léčba však nebyla dost účinná a později se ukázalo, že po expozici dítěte v prenatálním stavu diethylstilbestrolem se zvýšil výskyt genitálních karcinomů u ženského pohlaví a poruchy plodnosti u mužského pohlaví [39,49].

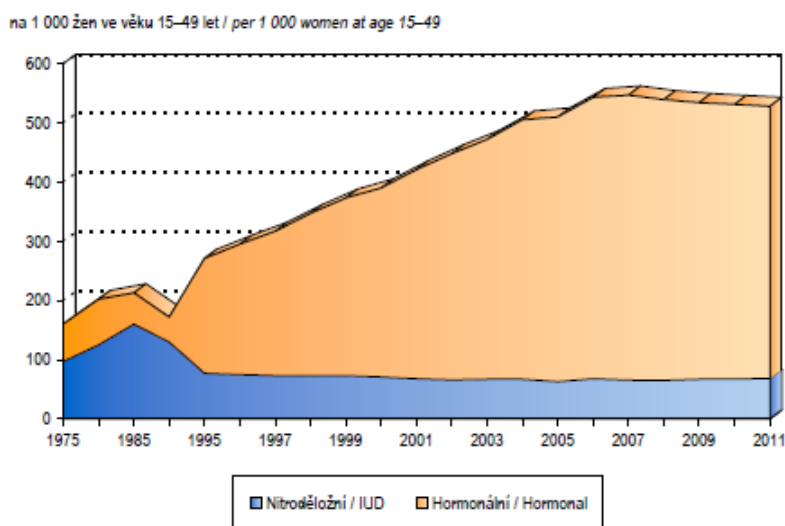
Podle IARC je od roku 2012 zařazen do skupiny 1 – látky karcinogenní pro člověka [52].



**Obr. 27: Diethylstilbestrol**

### 2.3.2 Vstup estrogenů do složek životního prostředí

Primárním zdrojem těchto látek je člověk, ženy jich produkují o mnoho více než muži. Uvolněné estrogény jsou z těla vylučovány přirozeně v poměrně malém množství, které ale může být u žen výrazně zvýšeno při užívání hormonální antikoncepce. Na následujícím grafu je patrný výrazný nárůst počtu uživatelů hormonální antikoncepce od počátku devadesátých let přibližně do roku 2007. Od tohoto roku je patrný lehký pokles v užívání hormonální antikoncepce, avšak stále ji užívá 52,8 % žen ve věku 15 – 49 let (údaj platný k roku 2011) [53].



Obr. 28: Počet uživatelů hormonální antikoncepce [53]

Nejčastěji se užívá perorální kombinovaná hormonální antikoncepce, která kombinuje estradiol a progesteron. Ovšem, jak je uvedeno výše, obě látky jsou v přírodní formě pro perorální podání málo účinné, proto se do těchto přípravků používají jejich lépe vstřebatelné syntetické deriváty. Místo estradiolu je použit prakticky výhradně ethinylestradiol, místo progesteronu syntetické progestiny, kterých je celá řada a záleží tedy na druhu antikoncepce. Množství estrogenu se v přípravcích pohybuje mezi 15 – 50 µg, množství gestagenů je různé podle jejich účinnosti [39,54].

Látky se dostávají odpadními vodami až na městské čistírny vod, zde ovšem nejsou některé dostatečně zachyceny a mohou přecházet dále do recipientu, kde působí na vodní organismy a odtud mohou být transportovány do dalších složek ekosystému. Není tak vyloučena ani kontaminace podzemních vod a zdrojů vod pitných. V případě, že se kal z čistíren vod využívá jako hnojivo na zemědělských plochách, může dojít ke kontaminaci prostředí i touto cestou. Stejně tak z plodin, které se na těchto plochách vypěstují, může dojít ke kontaminaci potravního řetězce [55,56].

Poměrně vydatným zdrojem estrogenů je též odpad z chovu hospodářských zvířat. Množství vyloučených estrogenů se zde liší v závislosti na druhu, stáří, pohlaví a reprodukční fázi. Bylo zjištěno, že střevní mikroflóra je schopna transformovat steroidy v exkrementech, ale její činnost není dostatečná pro rychlou a úplnou degradaci a eliminaci hormonální aktivity, zejména pokud se jedná o syntetické hormony [57].

### **2.3.2.1 Povrchové vody**

Jsou to povětšinou nejvíce exponované části životního prostředí, zejména v okolí aglomerací a současně s tím i v okolí čistíren odpadních vod. Výskyt xenobiotik v těchto oblastech se výrazně liší v závislosti na technologii čištění odpadní vody i na složení a stavu vodního ekosystému v dané oblasti [56].

### **2.3.2.2 Podzemní vody**

Tato oblast je poměrně málo prozkoumaná. Pokud se kontaminace těchto zdrojů potvrdila, šlo povětšinou o výluhy z blízkých skládek nebo jiných bodových zdrojů, například netěsnosti kanalizace. Přesto toto znečištění ve srovnání s povrchovými vodami bylo malé, pravděpodobně proto, že podzemní vody jsou dobře izolovány a půda má nízkou propustnost a dobrou sorpční schopnost [56].

### **2.3.2.3 Pitné vody**

Nádrže sloužící pro úpravu pitné vody jsou nejčastěji zásobovány vodou povrchovou, takže jistá kontaminace se dá předpokládat a byla i různými studiemi potvrzena. Důležité je, jestli při úpravě pitné vody dojde k odstranění xenobiotik, nebo zda se dostanou vodovodní sítí až ke spotřebiteli. V České republice byla například studována situace pro Prahu, která je zásobena z významné části pitnou vodou z úpravní Želivka a z vodárny v Káraném. Bylo zjištěno, že po úpravě vody z Želivky dosahuje koncentrace estrogenů  $2,3 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ , zatímco ve vodě z Káraného estrogeny nebyly zjištěny [58].

Podobná studie proběhla i v Paříži a bylo zjištěno, že voda upravovaná z řeky Seiny ve vodovodní síti obsahovala  $2,1 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  estradiolu a  $0,5 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  ethinylestradiolu. Protože jsou známy vlastnosti estrogenů a současně je jisté, že čistírny odpadních vod veškeré estrogeny nezachytí, je nezbytné do úpravy pitné vody zapojit procesy, jež zbytkové estrogeny odstraní [59].

Jako jeden z možných procesů odstranění estrogenů se jeví perchlorace. Bylo prokázáno, že využitím chloru se odstraní estrogeny s účinností větší než 99 %. Chlor zde pravděpodobně reaguje s fenolickou strukturou sloučenin [60].

V další studii se k odstranění estrogenů dobře osvědčila sorpce na granulované aktivní uhlí a membránové filtrační metody s využitím reverzní osmózy a nanofiltrace, které pracovaly s účinností vyšší než 95 %. Velmi dobrých výsledků bylo též dosaženo spojením nanofiltrace a koagulace hlinitými solemi. Za nejvhodnější metody jsou považovány ozonizace a UV záření. Ovšem jejich problém spočívá jednak v ceně a jednak v nutnosti výzkumu toxicity vznikajících produktů, neboť estrogeny sice použitím těchto metod ztratí svoji aktivitu, nelze ovšem s jistotou říci, že by se staly v pitné vodě zcela neškodnými [61,62].

### **2.3.2.4 Půda a sedimenty**

Do těchto složek životního prostředí se xenobiotika dostávají nejčastěji aplikací čistírenských kalů. Ve většině případů dochází k sorpci na částice půdy. V případě přítomnosti jílovitých částic se jedná o dvoustupňový proces. Počáteční sorpce probíhá rychle a pak následuje pomalé vychytávání jílovitými částicemi v řádu několik dní. Je nutné věnovat zvláštní pozornost degradačním produktům, protože mohou prosakovat do spodních vod

a dále se šířit prostředím. Sorpce na částice půdy může být též využita k odstranění estrogenů z vodního prostředí [56,63].

### **2.3.3 Účinky estrogenů na organismy**

Estrogeny působí jako endokrinní disruptory. Napodobují hormony, vážou se místo nich na receptory a vyvolávají odezvy. Mohou působit tak, že receptor buď aktivují a odezva je stejná jako na hormon, nebo naopak jej inaktivují a naruší tak metabolismus hormonů.

Estrogeny nejvíce působí na vodní organismy, které jsou velmi citlivé již na nízké koncentrace. U ryb vyvolávají nepřiměřenou tvorbu fosfolipoglykoproteinů sloužících jako prekursorů tvorby vaječného žloutku u nižších obratlovců, a tento jev je pozorován nejen u samic, ale i u exponovaných samečků. Dochází tak k feminizaci samců a k poškození reprodukčních schopností, což může mít fatální důsledky pro zachování druhů.

Nelze vyloučit i jejich vliv na vývojové poruchy u člověka, neboť tyto látky znamenají potenciální riziko vzniku různých abnormalit v estrogenních cílových tkáních plodu. Některá fakta nasvědčují tomu, že vlivem expozice estrogeny dochází u mužů k poklesu produkce spermií a tím ke snížení plodnosti. Zvyšují riziko abnormalit krevní srážlivosti, která může způsobit například plicní embolii nebo hlubokou žilní trombózu, což je významně limitující faktor při předepsání hormonální antikoncepce lékařem [39,54].

Naopak působení fytoestrogenů na lidský organismus bývá hodnoceno pozitivně. Vykazují preventivní účinky proti rakovině, antioxidační efekt, působí jako prevence kardiovaskulárních onemocnění, mají ochranné účinky před osteoporózou. U této skupiny není třeba obav před estrogenními účinky, neboť vykazují relativně nízkou estrogenitu, obecně jsou rozpustnější a nekumulují se tak v tkáních [54].

## **2.4 Metody izolace analytů ze vzorků**

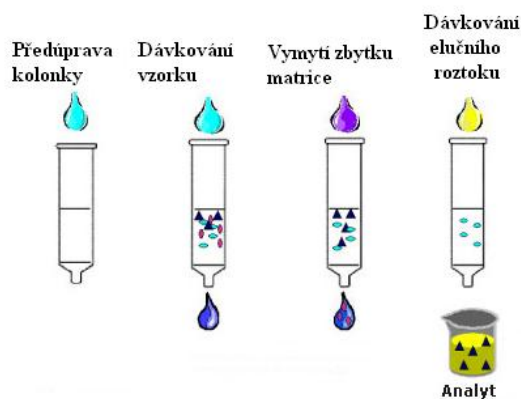
Existuje několik druhů metod izolace analytů ze vzorků. Rozlišujeme je na ty, jež se použijí pro kapalné vzorky, na metody použitelné pro vzorky v pevném stavu a na metody izolace plynných látek.

Pro kapalné vzorky se dnes nejčastěji využívá metody extrakce na pevné fázi (SPE). Jako sorbent je obecně nejpoužívanější Oasis HLB, jako činidlo pro eluci zachycených látek se využívá například ethylacetát, methanol, směs methanolu a acetonu, nebo směs methanolu a dichlormethanu. Výtěžnost této metody se pohybuje běžně mezi 75 – 100 % [64].

### **2.4.1 SPE – Solid Phase Extraction**

Principem metody je sorpce analytu na tuhou fázi z fáze kapalné, přičemž musí být splněn požadavek, že interakce analytu s tuhou fází je silnější než s fází kapalnou.

Samotný postup izolace pomocí SPE se skládá z následujících kroků: kondicionace kolonek, dávkování vzorku, promývání, sušení (dle potřeby) a eluce [65].



Obr. 29: Princip SPE [66]

V prvním kroku se kolonky promyjí vhodným rozpouštědlem, čímž se aktivuje pevná fáze pro interakce se vzorkem, a následně rozpouštědlem podobným vzorku, které upraví prostředí pro vlastní vzorek. Poté je nadávkován vzorek a dochází k interakcím látek ve vzorku s tuhou fází, sorpci. Následuje promývání vhodným rozpouštědlem, což umožňuje vymytí zbytků matrice vzorku (a případně i slabě vázaných interferentů) z kolonky, avšak žádané látky zůstávají sorbovány na pevné fázi. Dalším krokem (v případě potřeby) je sušení, které se nejčastěji uskutečňuje proudem inertního plynu (například dusíku). Posledním krokem je eluce. Kolonka se promývá malým objemem vhodného elučního činidla a dochází k selektivní desorpci cílových látek zachycených v pevné fázi a k jejich vymytí z kolonky [67].

Jde o velmi významnou extrakční metodu používanou jako alternativa k extrakci kapalina/kapalina, jejíž největší výhodou je snížení spotřeby organických rozpouštědel, což jsou často látky toxické i jinak nebezpečné. Je třeba si uvědomit, že touto metodou probíhá extrakce stopových množství analytů. V současnosti se běžně využívají komerční kolonky na jedno použití, které obsahují řádově miligramy až gramy vhodného sorbentu [65,68].

Mezi nejvíce používané metody pro extrakci pevných látek, sedimentů a kalů patří sonikace, mikrovlnná extrakce a vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PSE). Obecně platí, že výtěžnost z pevných látek je mnohem více proměnná než pro výtěžnost z kapalin a pohybuje se mezi 60 až 130 %. Nejpoužívanější rozpouštědlo ve všech metodách je methanol, ať již čistý nebo ve směsi s acetonem. Dále se využívá i směsi hexanu a acetonu. K extrakci estrogenních látek ze sedimentů a kalů se tedy používají polární rozpouštědla, která mohou zesílit účinek extrakce a ve výsledku tedy vyextrahovat i rušivé látky. Dle některých studií je vhodné následně extrakt před čištěním odstředit [64].

## 2.5 Metody stanovení steroidních látek ve vodách

Před stanovováním steroidních látek ve vodách je třeba si ujasnit, zda chceme stanovit jednotlivé látky, nebo jejich celkový estrogenní účinek.

V prvním případě jsou analytické metody založeny na separaci látek ze vzorku a jejich následném stanovení vhodnou chromatografickou metodou, kterou je nejčastěji vysokoúčinná kapalinová chromatografie, případně plynová chromatografie [50].

Využití kapalinové chromatografie se tak jeví pro stanovení steroidních látek výhodnější, neboť na rozdíl od plynové chromatografie není nutná derivatizace vzorku. Je popsáno

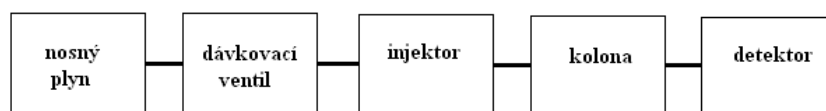
poměrně velké množství studií zaměřených na analýzy těchto látek v tělních tekutinách, jako je plazma nebo sérum, a to hlavně se zaměřením na testosteron a estradiol [69].

Ačkoliv tyto metody umožňují identifikaci a kvantifikaci látek estrogenního charakteru, v případě stanovení estrogenních účinků těchto látek je vhodnější využít metod biologických, nejčastěji využitím bioindikátorů [50].

### 2.5.1 Plynová chromatografie (GC)

Principem této separační metody je rovnovážná distribuce složek mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fáze je v tomto případě plyn, stacionární fáze může být kapalina nebo pevná složka. Nosný plyn slouží pouze k transportu analytu chromatografickým systémem, nedochází zde k jeho interakci se separovanými složkami ani se stacionární fází. Složky jsou vždy separovány v plynné fázi. Musí tedy dojít ke zplynění analytu, proto je tato metoda vhodná pro těkavé a polotěkavé látky. Podmínkou je, aby se látky při vypařování nerozkládaly [70,71].

Vzorek je nastříknut do proudu nosného plynu, kde dochází k jeho zplynění a je dále unášen do kolony. Součástí injektoru je dělič toku a liner, který slouží k ochraně kolony před případnými nečistotami ve vzorku, které zachytí. Po průchodu kolonou jsou separované látky vedeny do vhodného detektoru, kterým bývá často hmotnostní spektrometr [70].



Obr. 30: Schéma plynového chromatografu

Plynová chromatografie je metoda využívaná pro stanovení steroidních hormonů, protože je rychlá a má vysokou separační účinnost. Tato metoda se využila například pro analýzu estrogenů ve vodném prostředí, respektive v moči. Citlivost vybrané metody v tomto případě byla zvýšena optimalizací experimentálních podmínek a detekční limity pak byly v řádu  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  [64,72].

Problém s použitím přímého stanovení GC bývá na straně steroidních látek, neboť tyto látky bývají málo těkavé a často i termicky labilní, proto je nutná jejich derivatizace. Ta ovšem nese řadu problémů, jako jsou: látky ve směsích mohou vyžadovat odlišné způsoby derivatizace, multifunkční steroidy mohou poskytovat směsi derivátů, je nutná pečlivá znalost směsi steroidů pro řádnou derivatizaci a v neposlední řadě je derivatizace časově náročná a často vyžaduje předčištění vzorku před nástřikem [64,73].

#### 2.5.1.1 GC s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS)

První takovýto systém byl sestaven roku 1956 [74]. Při používání náplňových kolon, kterými protékalo velké množství nosného plynu, musel být mezi přístroje zařazen mezičlen, který odváděl přebytečný nosný plyn pryč a udržoval tak vhodné vakuum pro správnou funkci hmotnostního spektrometru. Větší popularitu těmto systémům přineslo využívání kapilárních kolon v plynovém chromatografu. Těmi totiž protéká malé množství nosného plynu ve srovnání s náplňovými kolonami, a tak bylo umožněno přímé spojení obou technik (kapilární kolona je zavedena do iontového zdroje hmotnostního spektrometru). Výhodou metody je, že analyzované složky z plynového chromatografu odcházejí v plynném stavu a umožňují tak



využití elektronové ionizace, což je tvrdá ionizační technika, a díky tomu je možné výsledná spektra porovnávat s knihovnami. Je tedy možné identifikovat sloučeninu, aniž by bylo třeba vlastnit příslušný standard. Jako další výhoda se považuje skutečnost, že množství analytu odcházejícího z chromatografu je dostačující pro sejmutí kompletního hmotnostního spektra.

V současné době je spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie běžnou analytickou metodou, kombinující vysokou separační schopnost kapilární plynové chromatografie s detekcí vysoce specifickou pro daný analyt. Zároveň tato metoda umožňuje získat informace o struktuře neznámých látek [75,76].

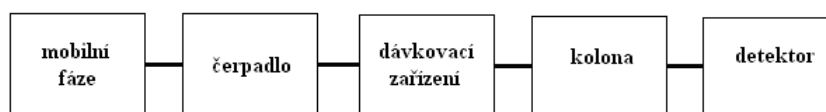
## 2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je separační metoda, při které probíhá rozdělení analytu mezi mobilní a stacionární fázi. Využívá se pro netěkavé či málo těkavé látky, které jsou termicky labilní. Vhodnou volbou charakteru mobilní a stacionární fáze lze separovat jak látky polární, tak látky nepolární. Stacionární fáze může být pevná či kapalná, mobilní fáze je vždy kapalná [70].

Vzorek je dávkován pomocí automatického dávkovače nebo ručně pomocí dávkovacího ventilu do mobilní fáze na vstup do kolony. Často bývá zařazena předkolona, která chrání vlastní kolonu před případnými nečistotami ze vzorku. Mobilní fáze unáší vzorek kolonou, kde dochází k interakci se stacionární fází a k separaci. Na výstupu z kolony je umístěn detektor, jehož odezva je přímo úměrná okamžité koncentraci látky v cele detektoru.

Zařízení pracuje za vysokého tlaku, který je vyvolán použitím velmi malých částecek jednotných rozměrů v náplni kolony. Velký nárok je též kladen na zařízení pro dávkování vzorku, neboť je vystaveno vysokým tlakům. Kolona i detektor jsou umístěny v termostatu, kde teplota nesmí během separace kolísat o více než 0,1 °C [70,77].

Ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií se využívá celá řada detektorů, ovšem nejvýznamnější pro stanovení estrogenů je spojení s hmotnostním spektrometrem. Dalším detektorem použitým pro stanovení estrogenních látek je spektrofotometrický detektor s diodovým polem [64].



Obr. 31: Schéma kapalinového chromatografu

### 2.5.2.1 HPLC s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS)

Spojení těchto technik umožňuje získat cenné informace o molekulových hmotnostech, případně i o struktuře látek s většími molekulovými hmotnostmi, větší polaritou, případně nižší tepelnou stabilitou, než mají látky stanovitelné plynovou chromatografií. Výzkum spojení těchto technik byl náročnější než v případě spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, neboť se zde vyskytly technické potíže. Jedním z nich byl rozdíl tlaků, kdy hmotnostní spektrometr pracuje za vysokého vakua, a na výstupu z kapalinového chromatografu jsou analyzované látky nesené mobilní fází za atmosférického tlaku. Dalším problémem byla mobilní fáze, neboť se jedná o kapalinu. Do iontového zdroje tak vstupuje řádově větší počet molekul než při zavádění plynné fáze a přechod k velmi kvalitnímu vakuu

je obtížnější. Bylo tedy nutné odstranit velký nadbytek mobilní fáze a převést analyzované látky do plynné fáze. Časem bylo vyvinuto množství různých technických řešení, z nichž ale většina má dnes už pouze historický charakter [78,79].

### *Ionizační techniky*

V počáteční fázi výzkumu se využívalo pro zařízení s přímým vstupem eluátu nebo při spojení s nekonečným dopravním pásem klasické elektronové ionizace, případě ionizace chemické. Spojení s přímým vstupem využívalo děliče toku, čili do hmotnostního spektrometru vstupoval pouze malý podíl eluátu. Docházelo tak ke zhoršení mezí detekce. Spojení bez děliče toku bylo využitelné pouze pro kolony s malým průměrem. Spojení s využitím nekonečného dopravního pásu bylo realizováno tak, že se eluát z kolony deponoval na drátek nebo nekonečný pásek (nejčastěji polyimidový), který se postupně posouval dále do vyhřívané zóny, kde se pod infračervenou lampou odpařila mobilní fáze. Pak byly analyzované látky na pásku vneseny do vakua iontového zdroje, kde došlo k mžikovému odpaření a ionizaci, případně byly přímo na pásu ionizovány desorpcí laserem. Aplikace této metody byla omezena na málo těkavé látky a častým problémem bylo též nedokonalé vyčištění pásu, či jeho mechanické poškození. Obě tyto techniky byly postupně překonány spojením Particle Beam. Toto spojení využívalo proudu helia ke zmlžení mobilní fáze po výstupu z kolony, jež byla dále odpařena v desolvatační komoře. Jako další krok byl zařazen tryskový separátor, kde se pomocí vakuových pump odsálo helium a zplynněná mobilní fáze, zatímco těžší molekuly analytu procházely do iontového zdroje [78,79].

Většího rozšíření spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí bylo dosaženo po zavedení „měkkých“ ionizačních technik, které umožňují použití průtoků běžných u konvenčních chromatografických kolon pouze s malým omezením pro mobilní fázi. Tyto techniky mají své výhody i nevýhody. Hlavní výhodou je možnost určení molekulové hmotnosti i pro látky, které u elektronové ionizace neposkytují molekulový pík. Na druhé straně tyto metody nedisponují knihovnami spekter a k fragmentaci zde nedochází vůbec nebo pouze v malém rozsahu, což je nevýhoda při odvození nebo potvrzení struktury. Avšak využitím tandemové hmotnostní spektrometrie lze fragmentaci podpořit. Nejvýznamnější „měkké“ ionizační techniky jsou elektrosprej (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [78,79].

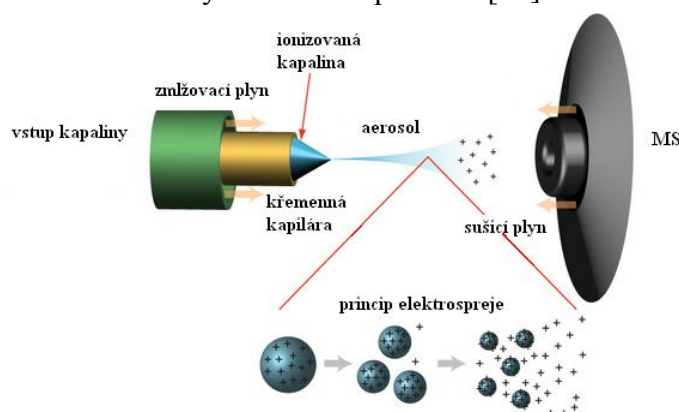
## Elektrosprej (ESI)

Při tomto způsobu ionizace se eluát z kolony kontinuálně přivádí do iontového zdroje kapilárou, která slouží jako elektroda a na níž je vloženo vysoké napětí, které je vytvořeno mezi ní a druhou elektrodou, což je vstup do hmotnostního spektrometru. Vznikne tak silné elektrostatické pole. Analyt je vytahován z nabité kapiláry pomocí druhé elektrody umístěné u vstupu do hmotnostního spektrometru a vytvoří se Taylorův kužel. Zvyšující se síla elektrického pole překonává síly povrchového napětí, což způsobuje uvolnění kapaliny z kapiláry. Po rozprášení mobilní fáze na výstupu z kapiláry vznikají malé kapičky s velkým nábojem, které vlivem odpařování rozpouštědla neustále zmenšují velikost, což vede ke zvyšování hustoty povrchového náboje a odpovídajícího nárůstu odpuzivých sil mezi jednotlivými kationty. V okamžiku překonání povrchového napětí kapičky coulombickými silami dojde k rozpadu a jako výsledek opakovaných coulombických explozí se uvolní protonované molekulární ionty. Fragmentové ionty jsou jen málo intenzivní nebo chybí zcela [78,79].

Účinnost elektrospreje závisí na produkci nabitých kapek analytu v ustáleném stavu, který bývá často narušován maticí vzorku a požadavky na rychlost toku analytu. Vývoj elektrosprejů využívajících čisté elektrostatické podmínky není příliš rozšířen. Významné využití této techniky je u kapilár o velmi malých průměrech označovaných jako nanoelektrospreje. Další vývoj těchto zdrojů je zaměřen na zlepšení životnosti, rozměrů a odolnosti přístrojů [80].

Jistou modifikací elektrospreje je takzvaný iontový sprej používající pro snadnější zplynění eluátu pneumatický zmlžovač na konci kapiláry [78,79]. Nejčastěji se jako zmlžovací plyn využívá dusík. V tomto případě je produkce aerosolu méně ovlivněna vyššími rychlostmi průtoku analytu a zároveň dochází k menšímu ovlivnění ionizace maticí vzorku. Technika vývoje iontového spreje se dále zaměřuje na zlepšení efektivnosti zmlžování/nabíjení aerosolu a účinnosti přenosu iontů do plynné fáze [80].

Bez ohledu na aktuální techniky, všechny formy elektrosprejů využívají nějakou formu nabíjení během procesu tvorby aerosolu. Přenos iontů z nabitých kapek je přirozeným důsledkem odpařování a nestability na nabitém povrchu [80].

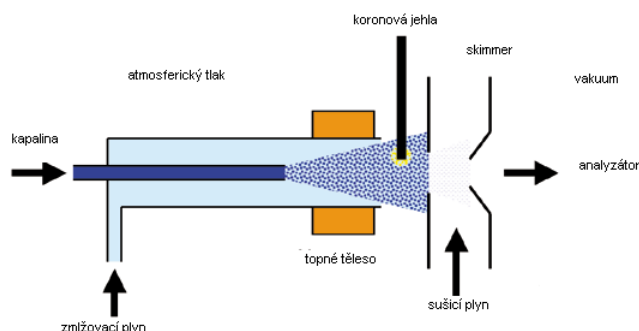


Obr. 32: Elektrosprej [81]

## Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Uspořádání je při této technice velmi podobné elektrospreji. Na kapiláru ovšem není vloženo napětí, k ionizaci dochází pomocí koronového výboje. Ke zmlžení eluátu se využívá pneumatický zmlžovač. Prostor zmlžovače se zahřeje na teplotu 450 °C, která usnadňuje odstranění rozpouštědla a tím zlepšuje účinnost chemické ionizace. Vložením napětí mezi koronovou jehlu a vstup do hmotnostního spektrometru se vytvoří koronový výboj ionizující molekuly mobilní fáze. Takto vzniklé ionty slouží jako reakční plyn pro ionizaci molekul analytu. Ve spektru jsou přítomny i fragmentové ionty, jejichž intenzitu lze zvýšit větším napětím vloženým na první skimmer [78,82].

Celková účinnost ionizace za atmosférického tlaku, to jest citlivost metody, je výrazně zlepšena z důvodu vysoké hustoty iontů a vysoké frekvenci reakčních kolizí v okolním tlaku. APCI je měkká ionizační technika, která produkuje hlavně jednoválcové ionty, jako jsou  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  a  $[M+NH_4]^+$ . Typy vytvořených iontů závisí na doplňujících látkách a maticích v roztoku vzorku. Vysoká teplota v iontovém zdroji není vhodná ke stanovení tepelně labilních látek [82].



Obr. 33: Chemická ionizace za atmosférického tlaku [83]

## Analyzátoary

Další důležitou součástí hmotnostního detektoru jsou analyzátoary. Tato zařízení dělí ionty podle jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Mezi ty nejpoužívanější patří kvadrupól (Q), sférická iontová past (3D-IT) a průletový analyzátor (Time of Flight, TOF) [79].

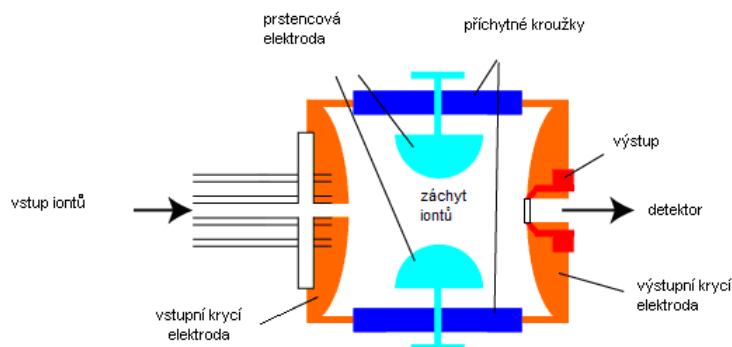
### Sférická iontová past (3D-IT)

Sférická iontová past je složena ze vstupní a z výstupní krycí elektrody a prstencové elektrody, na které se mění amplituda.

Ionty vzniklé externí ionizací jsou napěťovým pulzem přivedeny vstupním otvorem do pasti. Tam jsou vhodnými poměry napětí na prstencové elektrodě a krycích elektrodách zadrženy a vykonávají periodický pohyb. Postupnou změnou amplitudy radiofrekvenčního napětí na prstencové elektrodě dochází k vypuzování iontů podle jejich  $m/z$  na detektor. Do pasti bývá zaváděno helium jako tlumicí plyn, který tlumí oscilace a díky tomu se dosáhne zlepšení zachytu iontů [84].

Je též možné izolovat v pasti zvolený iont (prekurzor), jemuž je pak kolizní aktivací dodána energie, jež vyvolá jeho fragmentaci, a vzniklé produktové ionty jsou skenovány. Lze tudíž realizovat tandemovou hmotnostní spektrometrii v čase. Použitím sférické iontové pasti

Ize také realizovat tandemovou hmotnostní spektrometrii s více stupni ( $MS^n$ ), kdy se ze vzniklých fragmentů izoluje prekursor další generace [85].

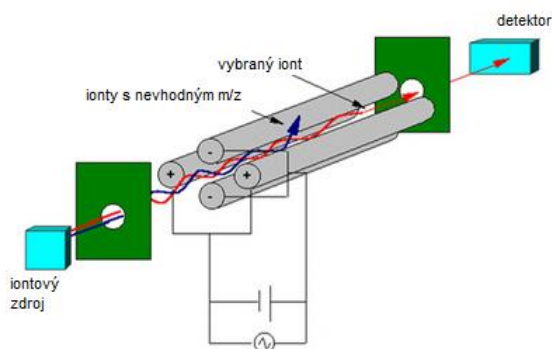


Obr. 34: Sférická iontová past [85]

### Kvadrupól (Q)

Analýzátor je tvořen čtyřmi symetricky uspořádanými elektrodami ve tvaru tyčí, přičemž protilehlé jsou vždy vodivě spojeny. Na elektrodách se stále mění náboj (ve zlomcích sekundy). Ionty jsou přivedeny do středu osy kvadrupólu a začnou oscilovat v rovině kolmé na tyče. Oscilace je stabilní v daný časový okamžik pouze pro iont s určitou hodnotou poměru  $m/z$ , který projde v ose mezi tyčemi, kde je nulové napětí, k detektoru. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích analyzátoru. Na detektor jsou postupně propuštěny všechny ionty z požadovaného rozsahu spektra, toho je docíleno plynulou změnou hodnot stejnosměrného napětí a amplitudy, jejichž poměr však zůstává konstantní.

V zařízení, kde jsou za sebou zařazeny tři kvadrupóly, je možné vyvolat fragmentaci. Prostřední z nich slouží jako kolizní cela, do které je veden kolizní plyn způsobující kolizní aktivaci iontů vybraných prvním kvadrupólovým analyzátozem a jejich následnou fragmentaci. Použitím toho zařízení pozorujeme více fragmentových iontů než u  $MS/MS$  měření iontovou pastí a to z důvodu možných opakování kolizních aktivací díky opakovaným srážkám iontů (jak prekursoru, tak i produktového iontu) s kolizním plynem [86].



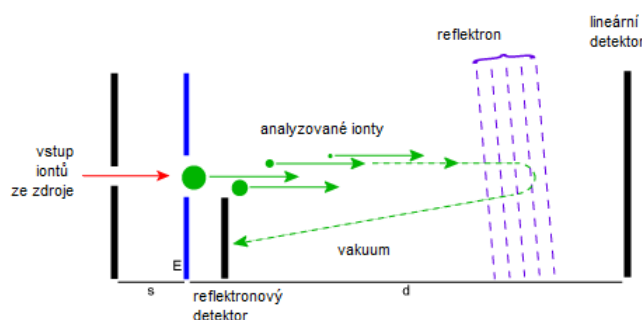
Obr. 35: Kvadrupól [87]

### Analyzátor doby letu (TOF)

Analyzátor doby letu (TOF) je nejjednodušší typ analyzátoru tvořený evakuovanou trubicí. Jedná se typicky pulzní hmotnostní analyzátor, protože nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny na vstupu do trubice a pak se měří přesný čas, za který dolétnou k detektoru. Podle tohoto času se určí poměr  $m/z$ . Ionty jsou urychleny najednou a mají tudíž stejnou kinetickou energii. Důležité je, že ionty o menší hodnotě  $m/z$  se pohybují rychleji v oblasti bez pole a tudíž se i rychleji dostanou k detektoru. Záznam spektra je velice rychlý a hmotnostní rozsah není teoreticky omezen.

Často je tento analyzátor použit ve spojení s iontovým zdrojem MALDI, jenž pracuje v pulzním režimu.

Aby se prodloužila dráha letu iontů a dosáhlo se lepšího rozlišení, zařazuje se do přístroje tzv. reflektory, který dráhu letu zdvojnásobuje [87].



Obr. 36: Analyzátor TOF [88]

#### 2.5.2.2 Ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) s ultrafialovou detekcí (UV)

Zkratka UPLC znamená Ultra Performance Liquid Chromatography. Jedná se o poměrně novou variantu kapalinové chromatografie, kterou na trhu představila firma Waters. Proces separace využívá speciálních náplní kolon o velmi malém průměru zrna, které jsou připraveny patentovanou technologií [89].

UPLC kolony vynikají díky tomu vysokou separační účinností, ovšem cenou za to je nutnost používat velmi vysoký tlak k udržení akceptovatelné průtokové rychlosti mobilní fáze. Tento systém přináší oproti klasické HPLC technice řadu výhod, mezi něž patří především kratší doba analýzy, způsobená zkrácením kolony, zmenšením jejího vnitřního průměru a zvýšením objemového průtoku mobilní fáze, dále pak vyšší separační účinnost, snížení meze detekce, zvýšení citlivosti a snížení nákladů, neboť je nižší spotřeba rozpouštědel [89].

Spojení separační techniky UPLC s UV detekcí bylo využito pro stanovení degradačních produktů estrogenů ve vodách. Byly stanovovány čtyři hlavní estrogeny a to estriol, estradiol, ethinylestradiol a estron. Tato technika je pro svůj vyšší výkon a lepší rozlišení vhodnější než HPLC-UV. Vzorky byly nejprve podrobeny extrakci na pevné fázi a následně separovány UPLC. Vhodná velikost částic v koloně byla  $1,7\ \mu\text{m}$ . Mez detekce byla v rozmezí  $12,5$  až  $23,7\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$  pro všechny čtyři estrogeny. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u estradiolu, který byl degradován ze 70 % a to s poločasem 30 hodin, a ethinylestradiolu, kde byla 55 % degradace za přibližně 36 hodin. Estron se nacházel ve vodě ve velmi nízké koncentraci a estriol nebyl během procesu vůbec detekován [90].

## 2.6 Vybrané metody analýzy estrogenních látek

Nejčastější analytickou metodou stanovení estrogenních látek ve vodách je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Mezi sledované matrice patří především odpadní voda, povrchová voda a sedimenty.

Obecně použitelná metoda pro stanovení estrogenních látek v různých vzorcích vody byla popsána španělskými vědci v článku, jehož cílem bylo sledování volných estrogenů a jejich konjugátů [91]. Analyty byly sledovány v povrchové vodě z řeky Ebro a v odpadní vodě ze dvou domovních čistíren odpadních vod v Katalánsku. Sledované látky byly z vod izolovány pomocí SPE (Oasis HLB, 500 mg). Před extrakcí se upravilo pH vzorku na hodnotu 7 použitím hydroxidu sodného. Pro finální analýzu izolovaných sloučenin byl využit kapalinový chromatograf HPLC 1200 Series od firmy Agilent Technologies a hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem od téže firmy. Mobilní fáze byla dvousložková s gradientem. Výsledky práce neprokázaly sledované sloučeniny v povrchové vodě, avšak v odpadní vodě na přítoku byl detekován ethinylestradiol ( $154 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ ), estron a estriol byly na hodnotách po mezí kvantifikace. Estradiol a diethylstilbestrol nebyly detekovány vůbec.

Podobnému problému byl věnován i článek z Japonska [92]. Jako matrice byla zvolena povrchová voda z řeky Tamagawa a z jezera Kasumigaura a odpadní voda z odtoku ze dvou městských čistíren, z nichž jedna ústila do výše jmenované řeky a druhá do uvedeného jezera. Sledované sloučeniny byly nejprve ze vzorků povrchové i odpadní vody izolovány metodou SPE (Autoprep EDS – 1, 500 mg). Extrakty byly okyseleny 1 ml kyseliny octové na hodnotu pH 3,5 – 5,0. Poté byl extrakt z první frakce přečištěn pomocí florisilové kolony. Jako analytická koncovka byl použit kapalinový chromatograf značky CapLC od firmy Waters s tandemovým hmotnostním spektrometrem značky Quattro Ultima od firmy Micromass. Mobilní fáze byla tříložková s gradientem. Ve studii byly detekovány pouze hormony: estron a  $\beta$ -estradiol. Ostatní sledované estrogenní látky –  $\alpha$ -estradiol, estriol a ethinylestradiol nebyly detekovány v žádném vzorku. V případě ethinylestradiolu je výsledek zřejmě důsledkem toho, že tento hormon se v Japonsku od září roku 1999 nesmí používat.

V dalším článku zabývajícím se estrogenními látkami v životním prostředí byly sledovanou maticí říční sedimenty [93]. Sedimenty pocházely ze dvou řek, a to ze severní části řeky Svratky a z řeky Loučky, která se nachází na Českomoravské vrchovině. Byly využity dva typy extrakce – modifikovaná Soxhletova extrakce a mikrovlnná extrakce. Analyty ze vzorků byly izolovány pomocí metody SPE (Oasis HLB 150 mg, Oasis WAX 150 mg, Oasis MAX 150 mg). K vlastní analýze estrogenních látek byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostním spektrometrem Finnigan LCQ Advantage Max. Mobilní fáze byla dvousložková s gradientem. V případě řeky Loučky byly výsledky uspokojivé. V řece byl detekován pouze estron. Výsledky v řece Svratce ukazují na přítomnost více druhů estrogenních látek a to na:  $\alpha$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol, estron a ethinylestradiol.

Estrogeny v odpadní vodě z městské čistírny odpadních vod v Břeclavi a z čistírny odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno byly sledovány v uvedené diplomové práci [94]. Úprava vzorků byla v první řadě filtrace a následná extrakce metodou SPE (Oasis HLB, 60 mg). Analytickou koncovkou byl kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series od firmy Agilent Technologies a hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series Ion Trap LC/MS od téže firmy. Mobilní fáze byla dvousložková s gradientem. V obou sledovaných vodách byly detekovány následující hormony: estriol, estradiol, ethinylestradiol,

estron a diethylstilbestrol. Z výsledků je tedy patrné, že nedochází zcela k odstranění estrogenů z odpadní vody a tudíž tyto látky představují významné kontaminanty vodního ekosystému.

Spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí bylo využito pro stanovení fenolických chemikálií narušujících endokrinní činnost organismů v povrchových vodách [95]. Sledovaným prostředím byl systém řek Pearl Rivers nacházející se v jižní Číně. I zde byla metodou extrakce SPE (Oasis HLB, 500 mg). Cílové sloučeniny byly analyzovány na plynovém chromatografu Agilent 6890N od firmy Agilent Technologies s hmotnostním detektorem Agilent 5975B MSD s chemickou ionizací od téže firmy. Byly sledovány dva estrogenní hormony – estron a estradiol. Ve třinácti odběrových místech ze čtrnácti byla prokázána přítomnost estronu. V sedmi odběrových místech ze čtrnácti byla též prokázána přítomnost estradiolu.

## **2.7 Technologické schéma úpravy**

Technologická linka úpravy spočívá v koagulaci a následné dvoustupňové separaci.

Surová voda přitékající do linky je vedena na kaskády, kde dojde k částečnému provzdušnění. Následuje hydraulický míšič, před kterým je do vody nadávkován koagulant – síran železitý. Z hydromíšiče je voda rozdělena a vedena na první separační stupeň, kterým je flotační linka. Do vody odtékající z prvního separačního stupně je dávkována vápenná voda a vápenné mléko pro alkalizaci. Voda je po té vedena na druhý separační stupeň – pískové filtry. Filtry se perou klasicky vzduchem a vodou. Po filtraci je do vody dávkován oxid chloričitý a chlor pro hygienické zabezpečení vody. Upravená voda je akumulovaná v nádrži, ze které je čerpána do distribuční sítě. Kal z praní filtrů a z prvního separačního stupně je vypouštěn na kalová pole, kde dojde k jeho odvodnění, a dále je likvidován kompostováním [96].



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Sledovaná matrice a odběr vzorků

Sledovanou matricí byla povrchová a pitná voda z úpravní vody, nacházející se v České republice.

Ke vzorkování matrice bylo využito pasivních vzorkovačů POCIS a dále skleněných vzorkovnic pro bodový odběr vzorků.

Pasivní vzorkovače byly umístěny ve třech místech technologické linky a to před flotační jednotkou, za flotační jednotkou a v akumulární nádrži s již upravenou pitnou vodou. Doba expozice byla 4 týdny. Poté byly vzorkovače rozebrány, expoziční části byly zabaleny do alobalu, uloženy do chladicího boxu a převezeny do laboratoře, kde byly umístěny do mrazáku.

Bodově byly odebrány vzorky surové vody, neboť z technicko-organizačních důvodů nebylo možné umístit na přítok surové vody pasivní vzorkovače. Dále byly odebrány bodové vzorky i ze všech tří míst s pasivními vzorkovači. Vzorky byly odebrány do předčištěných tmavých skleněných lahví o objemu 2 litry. Před odběrem byly lahve propláchnuty odebíranou vodou. Takto odebrané vzorky byly transportovány do laboratoře v chladicích boxech a tam byly umístěny do lednice.

### 3.2 Chemikálie a přístroje

#### *Rozpouštědla a mobilní fáze*

Deionizovaná voda (Milli-Q)

Acetonitril – CAS: 75-05-8, čistota 99 % (Sigma Aldrich, Francie)

Methanol – CAS: 67-56-1, čistota 99,8 % (Baker, Nizozemsko)

Ethynylacetát – CAS: 141-78-6, čistota 99,8 % (MERCK, Německo)

n-Hexan – CAS: 110-54-3, čistota 98 % (MERCK, Německo)

Toluen – CAS: 108-88-3, čistota 99 % (LAB SCAN, Polsko)

Dichlormethan – CAS: 75-09-2, čistota 99 % (Merck, Německo)

2-propanol – CAS: 67-63-0, čistota 99 % (LAB SCAN, Polsko)

#### *Standardy*

Jako standardy byly využity následující hormony o čistotě 99 % (Sigma Aldrich, Francie).

Estron – CAS: 53-16-7

Estriol – CAS: 50-27-1

$\alpha$ -Estradiol – CAS: 57-91-0

$\beta$ -Estradiol – CAS: 50-28-2

Ethinylestradiol – CAS: 57-63-6

Diethylstilbestrol – CAS: 56-53-1

Progesteron – CAS: 57-83-0

Mestranol – CAS: 72-33-3

Norethindron – CAS: 68-22-4

### *Zařízení pro přípravu a extrakci vzorků*

Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko

SPE kolony Supelco, Supelclean ENVI-18, 500 mg, USA

Přístroj EVATERM pro sušení pod dusíkem, LABICOM s.r.o., ČR

Rotační vakuová odparka RVO-64, Mikrotechna, Česká republika

Běžné laboratorní vybavení

### *Přístroje pro analýzu*

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA)

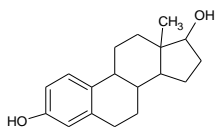
Hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, USA)

Kolona Kinetex C18, 150 x 3,00 mm, velikost částic 2,6 µm (Phenomenex, USA)

## 3.3 Sledované analyty

### *Estradiol*

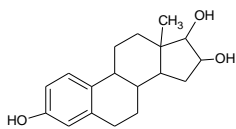
- sumární vzorec:  $C_{18}H_{24}O_2$



- strukturní vzorec: Oc1ccc2c(c1)CCC3=C2CCC4(C)CCC(O)C4
- systematický název dle IUPAC: (8R,9S,13S,14S,17S)-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahydrocyclopenta[a]fenanthren-3,17-diol
- molekulová hmotnost: 272,38
- CAS: 50-28-2
- špatně rozpustný ve vodě, dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech

### *Estriol*

- sumární vzorec:  $C_{18}H_{24}O_3$

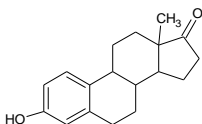


- strukturní vzorec: Oc1ccc2c(c1)CCC3=C2CCC4(C)CCC(O)C4O
- systematický název dle IUPAC: (8R,9S,13S,14S,16R,17R)-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahydrocyclopenta[a]fenanthren-3,16,17-triol
- molekulová hmotnost: 288,38
- CAS: 50-27-1

- špatně rozpustný ve vodě, dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech

#### *Estron*

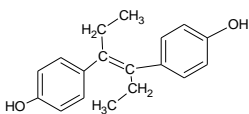
- sumární vzorec:  $C_{18}H_{22}O_2$



- strukturní vzorec: Oc1ccc2c(c1)CCC3C2CCC4C3CCC(=O)C4C
- systematický název dle IUPAC: (8R,9S,13S,14S)-3-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-oktahydro-6H-cyklopenta[a]fenanthren-17-on
- molekulová hmotnost: 270,37
- CAS: 53-16-7
- špatně rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v organických rozpouštědlech

#### *Diethylstilbestrol*

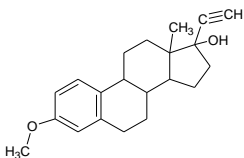
- sumární vzorec:  $C_{18}H_{20}O_2$



- strukturní vzorec: CC(C)=C(Cc1ccc(O)cc1)C=C(Cc2ccc(O)cc2)
- systematický název dle IUPAC: 4-[(E)-4-(4-hydroxyfenyl)hex-3-en-3-yl]fenol
- molekulová hmotnost: 268,35
- CAS: 56-53-1
- špatně rozpustný ve vodě, dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech

#### *Ethinylestradiol*

- sumární vzorec:  $C_{20}H_{24}O_2$

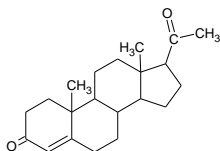


- strukturní vzorec: COc1ccc2c(c1)CCC3C2CCC4C3CCC(O)C4C#C
- systematický název dle IUPAC: (8R,9S,13S,14S,17R)-17-ethynyl-13-methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-oktahydro-6H-cyklopenta[a]fenanthren-3,17-diol
- molekulová hmotnost: 296,40
- CAS: 57-63-6

- špatně rozpustný ve vodě, dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech

### *Progesteron*

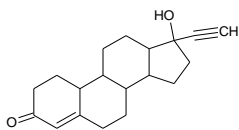
- sumární vzorec:  $C_{21}H_{30}O_2$



- strukturní vzorec:
- systematický název dle IUPAC: (8S,9S,10R,13S,14S,17S)-17-acetyl-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodekahydrocyclopenta[a]fenanthren-3-on
- molekulová hmotnost: 314,46
- CAS: 57-83-0
- špatně rozpustný ve vodě, dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech

### *Norethindron*

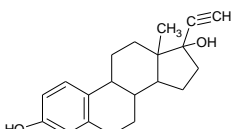
- sumární vzorec:  $C_{20}H_{26}O_2$



- strukturní vzorec:
- systematický název dle IUPAC: (8R,9S,10R,13S,14S,17R)-17-ethynyl-17-hydroxy-13-methyl-1,2,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16-dodekahydrocyclopenta[a]fenanthren-3-on
- molekulová hmotnost: 298,42
- CAS: 68-22-4
- špatně rozpustný ve vodě, dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech

### *Mestranol*

- sumární vzorec:  $C_{21}H_{26}O_2$



- strukturní vzorec:
- systematický název dle IUPAC: (8R,9S,13S,14S,17R)-17-ethynyl-3-methoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-oktahydro-6H-cyclopenta[a]fenanthren-17-ol

- molekulová hmotnost: 310,42
- CAS: 72-33-3
- špatně rozpustný ve vodě, dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech [97]

### 3.4 Příprava standardů, izolace analytů

Jako vhodné rozpouštědlo pro přípravu standardů byla zvolena směs acetonitrilu a deionizované vody o poměru 6:4. Zásobní roztoky standardů byly připraveny o koncentraci  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Smícháním a následným ředěním byly připraveny kalibrační roztoky.

Analyty z bodově odebraných vzorků byly izolovány metodou SPE za následujících podmínek:

SPE	
Typ kolonek:	Supelclean ENVI-18, 500 mg
Kondicionace:	5 ml n-hexanu 5 ml ethylacetátu 5 ml methanolu 10 ml Mili Q-vody
Vzorek:	400 ml
Sušení:	20 min proudem vzduchu
Eluce:	6 ml směsi ethylacetát:methanol (5:1)
Rozpuštění analytu:	1 ml methanolu

Analyty z pasivních vzorkovačů byly izolovány následujícím způsobem [3]:

Použitá, prázdná SPE kolonka byla promyta methanolem a vysušena. Pasivní vzorkovače byly volně rozmrazeny, rozšroubovány a membrány odděleny pinzetou. Pomocí methanolu byl sorbent z membrány smyt do kolonky. Methanol se jímá do odpařovací baňky. Takto připravený sorbent byl eluován 50 ml směsi methanol:toluen:dichlormethan (1:1:8), eluát byl jímán do týchž odpařovacích baněk jako v předchozím kroku methanol. Objem eluátu v baňce byl snížen vakuovou odparkou asi na 0,5 ml. K odparku bylo přidáno 1,5 ml 2-propanolu. Objem baňky byl přesušen přes bezvodý síran sodný následujícím způsobem. Na dno Pasteurovy pipetky byl dán smotek acetonové vaty a na něj byla nanесena centimetrová vrstva síranu sodného. Vysušený eluát byl jímán do vialek a následně byl odpařen pod dusíkem na objem cca 1 ml.

### 3.5 Analýza standardů a vzorků

Analýza standardů hormonů a reálných vzorků byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí s ionizací elektrosprejem (HPLC/ESI-MS). Pro stanovení byla využita kolona Kinetex C18 (150 x 3,00 mm, o velikosti částic 2,6  $\mu\text{m}$ ).

### 3.5.1 Podmínky analýzy

HPLC/MS	
nástřik:	10 µl
mobilní fáze:	A: Mili Q-voda B: acetonitril
průtok mobilní fáze:	0,25 ml/min
teplota kolony:	25 °C
gradient mobilní fáze:	0 min – 60 % A; 40 % B 20 min – 10 % A; 90 % B
celková doba analýzy:	30 min vlastní analýza: 20 min doba ustálení tlaku: 10 min
tlak zmlžovacího plynu:	25 psi
teplota sušícího plynu:	350 °C
průtok sušícího plynu:	10 l/min
rozsah skenovaných hmot (m/z):	50 – 600
detekční mód:	Alternující
MS/MS:	Manual

Estrogeny	Sledované ionty		Retenční čas t (min)
	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	
estriol	287,1	170,9	3,7
α-estradiol	271,1	253,1	10,2
β-estradiol	271,1	269,1	9,6
estron	269,2	267,1	11,3
diethylstilbestrol	267,1	238,0	12,6
ethinylestradiol	295,2	267,1	10,8
progesteron	315,1	279,1	16,1
norethindron	299,1	223,1	10,4

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace podmínek analýzy

Chromatografické podmínky byly optimalizovány za použití roztoků standardů jednotlivých výše uvedených hormonů o koncentracích  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### 4.1.1 Optimalizace typu kolony

Byly vyzkoušeny tři typy kolon. Nejprve byly hormony separovány na koloně ZORBAX Elipse XDB-C8 (2,1 x 150 mm; velikost částic 3,5  $\mu\text{m}$ ). Tato kolona ovšem nebyla nejvhodnější, neboť z výsledků z UV detektoru bylo zřejmé, že na ní nedochází k ideálnímu rozdělení látek.

Další vyzkoušené kolony byly KINETEX C18 (2,1 x 100 mm; velikost částic 1,7  $\mu\text{m}$ ) a KINETEX C18 (3 x 150 mm; velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$ ). Pro vlastní analýzu byla vybrána druhá ze jmenovaných kolon, na které se jednotlivé hormony dobře rozseparovaly a která umožňuje nástřik většího množství vzorku.

#### 4.1.2 Optimalizace teploty kolony

V rámci optimalizace metody bylo vyzkoušeno pět různých teplot kolon: 20, 25, 30, 35 a 40 °C. Při změnách teploty dochází k posunu retenčních časů jednotlivých analytů a k případnému rozmývání píků. Na základě výsledků byla vybrána teplota 25 °C, která splňovala požadavky na optimalizaci teploty, kterými jsou co nejkratší doba analýzy při akceptovatelné separaci píků.

#### 4.1.3 Optimalizace mobilní fáze

Při optimalizaci metody byly ověřovány tři druhy mobilní fáze. Prvním druhem byla směs methanolu a deionizované vody. Tato mobilní fáze nebyla nejvhodnější, protože v ní nedocházelo k celkovému rozseparování hormonů, které se ionizují v negativním módu.

Druhý druh mobilní fáze byl opět methanol a demineralizovaná voda a navíc postkolonový přídavek 1% roztoku octanu amonného, který zlepšuje ionizaci hormonů, jež se ionizují v pozitivním módu [98]. Tento druh mobilní fáze nakonec nebyl použit, protože průtok z kapalinového chromatografu s přídavkem octanu na elektrosprej byl vysoký a při nízkých koncentracích analytů docházelo k rozmývání píků a tudíž na výstupu z hmotnostního detektoru nebyly jednotlivé hormony detekovatelné.

Třetím druhem mobilní fáze byla směs acetonitrilu a deionizované vody. Při použití této mobilní fáze byla detekce jednotlivých hormonů nejlepší a to i u hormonů ionizovatelných v pozitivním módu, proto byla tato směs využita pro analýzu.

#### 4.1.4 Optimalizace gradientu mobilní fáze

Byly ověřovány různé gradienty vybrané mobilní fáze. Jako nejvhodnější byl zvolen gradient uvedený v následující tabulce:

Čas (min)	Mili Q-voda:acetonitril
0	60:40
20	10:90

Při použití toho gradientu byly píky jednotlivých hormonů úzké a jejich separace byla uspokojivá. Při použití jiného gradientu se odezva na různé koncentrace hormonů značně lišila.

## 4.2 Výtěžnost metody SPE

Vhodné podmínky metody SPE pro sledované analyty byly zjišťovány pomocí modelových vzorků vody, které byly připraveny umělou kontaminací známou koncentrací vybraných hormonů.

Byly ověřeny celkem dva způsoby extrakce. Při prvním z nich byl na kondicionaci kolonek použit methanol a deionizovaná voda a eluce probíhala methanolem a dichlormethanem [94]. Tento postup však nebyl vhodný, neboť bylo dosaženo malé výtěžnosti pro jednotlivé hormony. Při druhém způsobu proběhla kondicionace kolonek n-hexanem, ethylacetátem, methanolem a deionizovanou vodou. Jako eluční činidlo byla použita směs ethylacetátu a methanolu (5:1) [94]. Avšak oproti uvedené práci byly použity kolonky firmy Supelco Supelclean ENVI-18, 500 mg. V případě tohoto typu extrakce byla výtěžnost dobrá, pohybující se v rozmezí 74 – 97 %.

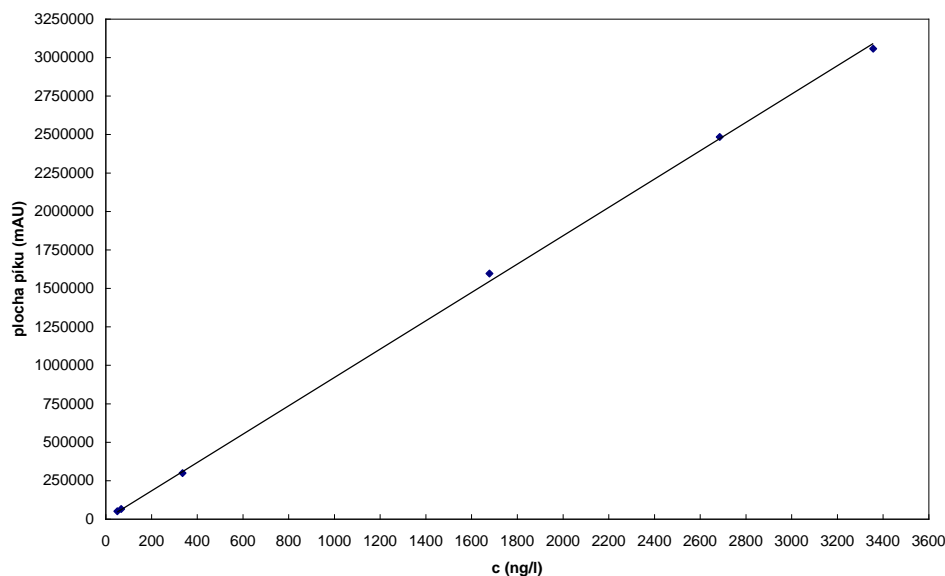
### 4.2.1 Výtěžnost estronu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci hormonu. Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 920,96x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9995$ .

Výtěžnost byla vypočítána z průměrné hodnoty z deseti paralelních měření. V případě estronu byla průměrná výtěžnost 74,48 %.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu 20,48 ng·l<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti 68,27 ng·l<sup>-1</sup>.





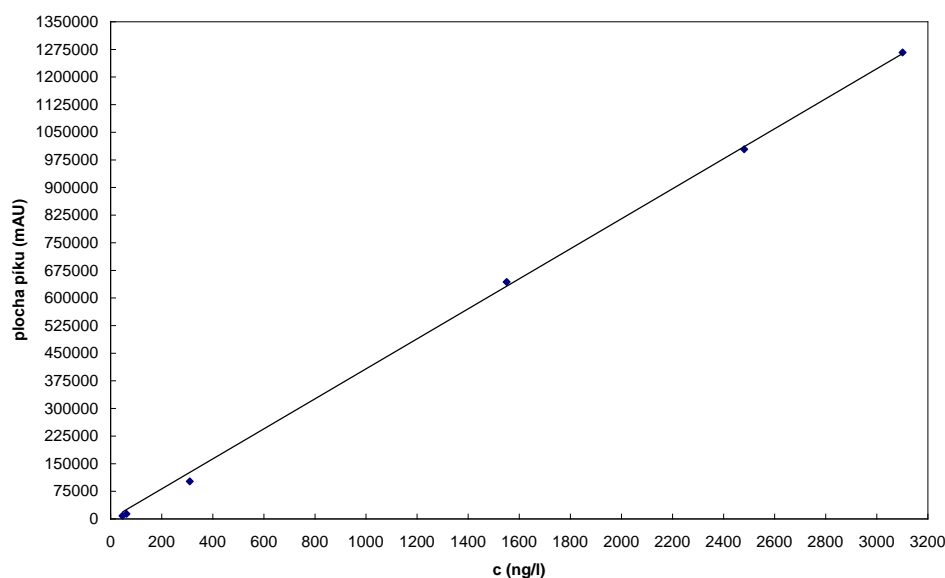
**Graf 1: Kalibrace SPE - estron**

#### 4.2.2 Výtěžnost $\alpha$ -estradiolu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 407,47x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9993$ .

Výtěžnost byla vypočítána z průměrné hodnoty z deseti paralelních měření. V případě stanovení  $\alpha$ -estradiolu byla průměrná výtěžnost 76,98 %.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti:  $LOD = 54,79 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $LOQ = 182,66 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



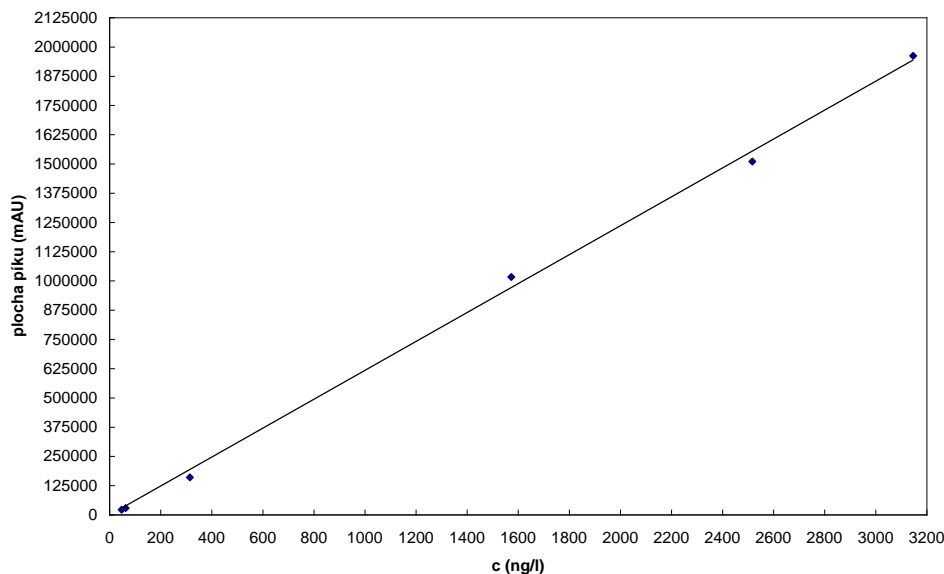
**Graf 2: Kalibrace SPE -  $\alpha$ -estradiol**

### 4.2.3 Výtěžnost $\beta$ -estradiolu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 618,04x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9984$ .

Výtěžnost byla vypočítána z průměrné hodnoty z deseti paralelních měření. V případě stanovení  $\beta$ -estradiolu byla průměrná výtěžnost 79,46 %.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti:  $LOD = 30,32 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $LOQ = 101,12 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ .



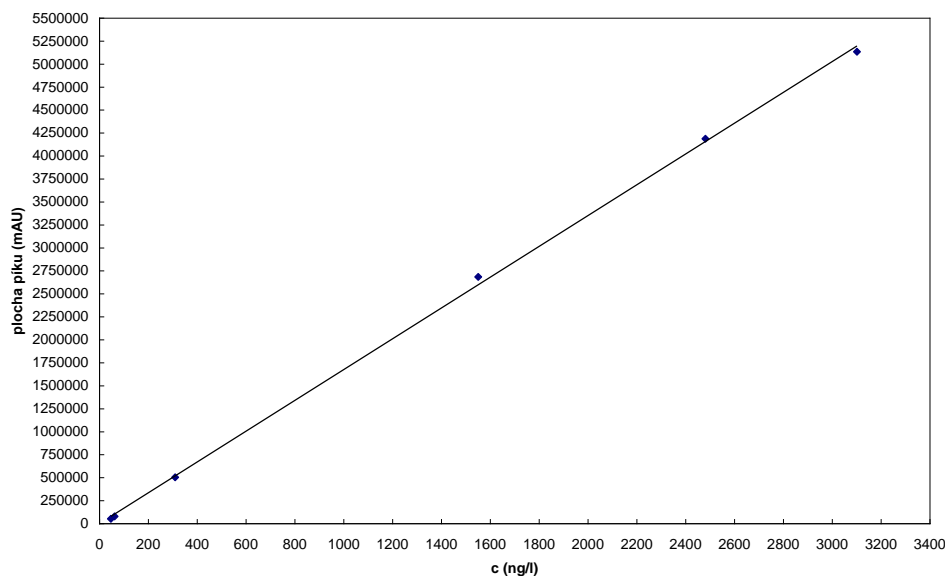
Graf 3: Kalibrace SPE -  $\beta$ -estradiol

### 4.2.4 Výtěžnost estriolu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 1676x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9995$ .

Výtěžnost byla vypočítána z průměrné hodnoty z deseti paralelních měření. V případě stanovení estriolu byla průměrná výtěžnost 80,61 %.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti:  $LOD = 10,74 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $LOQ = 35,78 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ .



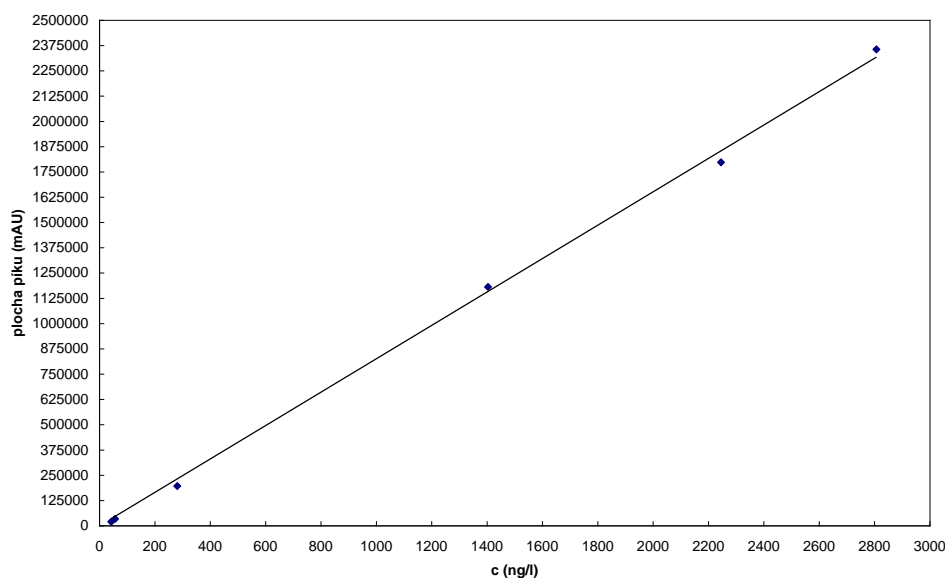
**Graf 4: Kalibrace SPE - estriol**

#### 4.2.5 Výtěžnost ethinylestradiolu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 825,74x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9987$ .

Výtěžnost byla vypočítána z průměrné hodnoty z deseti paralelních měření. V případě stanovení ethinylestradiolu byla průměrná výtěžnost 89,07 %.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti:  $LOD = 27,06 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $LOQ = 90,21 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



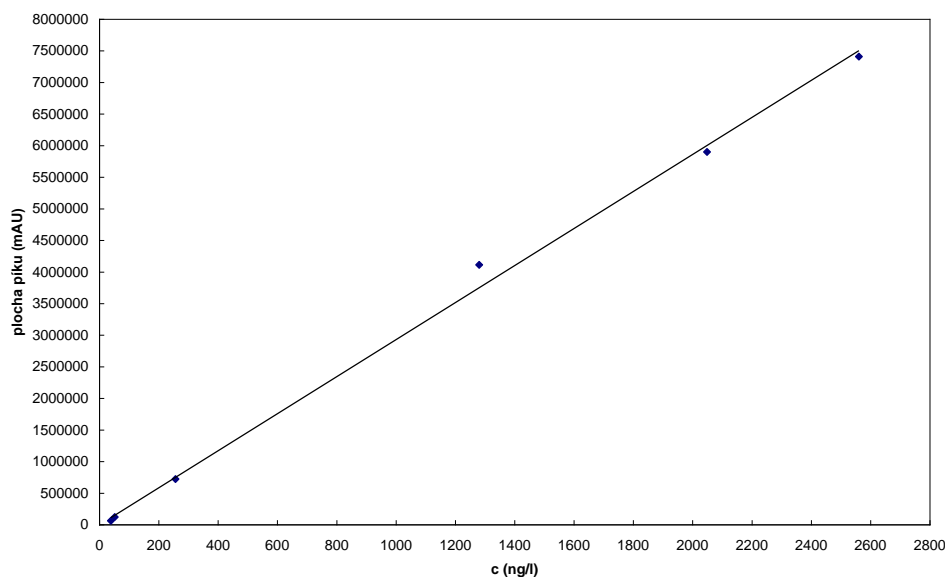
**Graf 5: Kalibrace SPE - ethinylestradiol**

#### 4.2.6 Výtěžnost diethylstilbestrolu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 2390,2x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9970$ .

Výtěžnost byla vypočítána z průměrné hodnoty z deseti paralelních měření. V případě stanovení diethylstilbestrolu byla průměrná výtěžnost 97,63 %.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti:  $LOD = 13,57 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $LOQ = 45,19 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



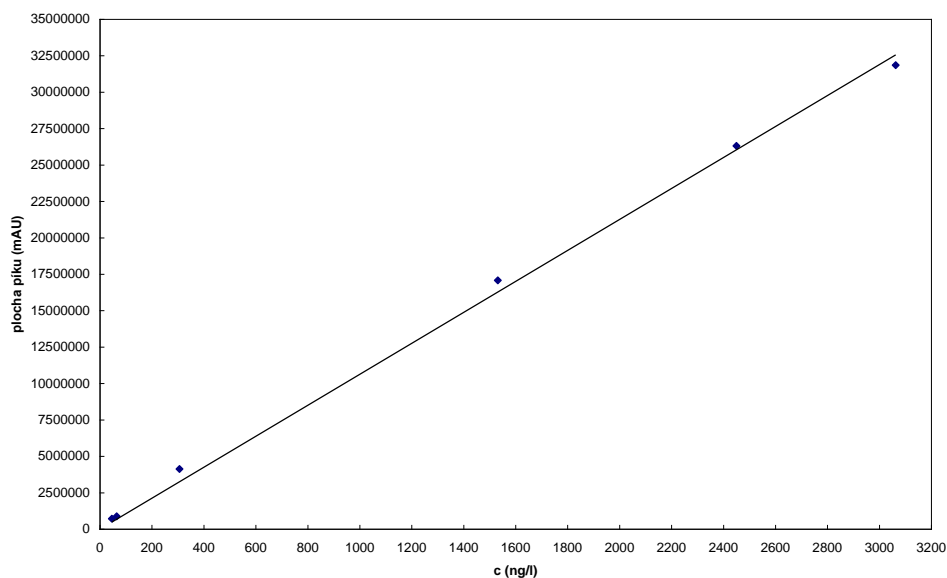
Graf 6: Kalibrace SPE - diethylstilbestrol

#### 4.2.7 Výtěžnost progesteronu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 10\,632x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9978$ .

Výtěžnost byla vypočítána z průměrné hodnoty z deseti paralelních měření. V případě stanovení progesteronu byla průměrná výtěžnost 81,63 %.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti:  $LOD = 19,17 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $LOQ = 63,92 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



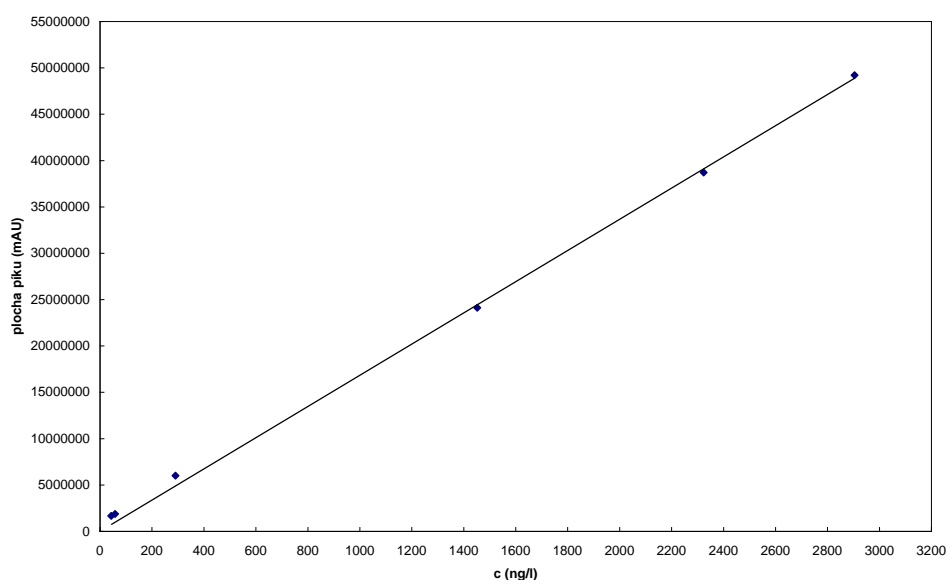
**Graf 7: Kalibrace SPE - progesteron**

#### 4.2.8 Výtěžnost norethindronu

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 16827x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9984$ .

Výtěžnost byla vypočítána z průměrné hodnoty z deseti paralelních měření. V případě stanovení norethindronu byla průměrná výtěžnost 86,07 %.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti:  $LOD = 8,26 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $LOQ = 27,52 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Graf 8: Kalibrace SPE – norehtindron**

**Tabulka 2: Tabulka s hodnotami LOD, LOQ a výtěžnosti pro metodu SPE**

Hormon	LOD (ng·l <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·l <sup>-1</sup> )	Výtěžnost (%)
estron	20,48	68,27	74,48
α-estradiol	54,79	182,66	76,98
β-estradiol	30,32	101,12	79,46
estriol	10,74	35,78	80,61
ethinylestradiol	27,06	90,21	89,07
diethylstilbestrol	13,57	45,19	97,63
progesteron	19,17	63,92	81,63
norethindron	8,26	27,52	86,07

### 4.3 Kalibrační závislosti pro vyhodnocení vzorkovačů POCIS

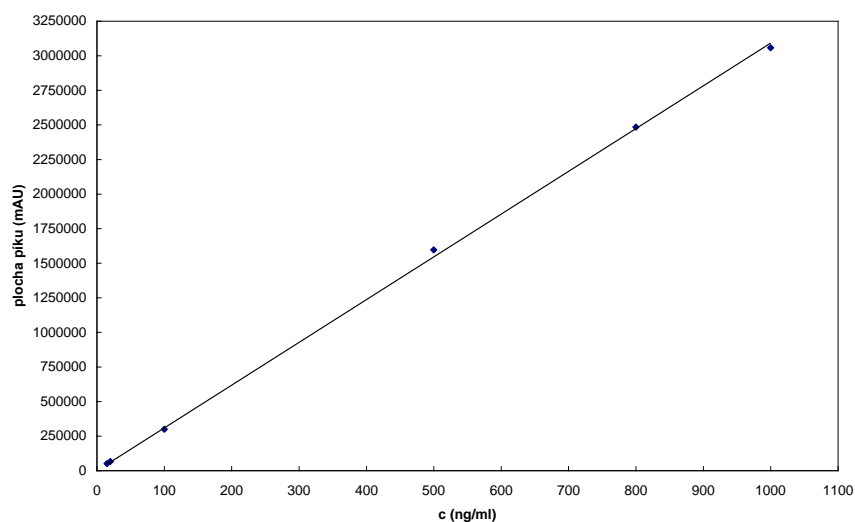
Výsledky získané ze sorbentů z pasivních vzorkovačů byly vyhodnoceny pomocí jiných kalibračních závislostí. Nejprve byla získána z rovnice regrese koncentrace analytu v extraktu, poté byla vypočítána hmotnost analytu v extraktu. Tato hodnota spolu se vzorkovací rychlostí specifickou pro danou látku, která byla převzata z literatury [35,99], byla dosazena do vzorce (13) a byla vypočítána průměrná koncentrace vzorkovaného analytu ve vzorkovaném médiu po dobu expozice. Doba expozice byla pro oba dva cykly 29 dní.

**Tabulka 3: Vzorkovací rychlost pro jednotlivé hormony [35,99]**

Hormon	R <sub>s</sub> (l·d <sup>-1</sup> )
estron	0,1292
α-estradiol	0,1220
β-estradiol	0,1150
estriol	0,1570
ethinylestradiol	0,2137
diethylstilbestrol	0,2069
progesteron	0,3460
norethindron	0,2841

#### 4.3.1 Kalibrační závislost estronu

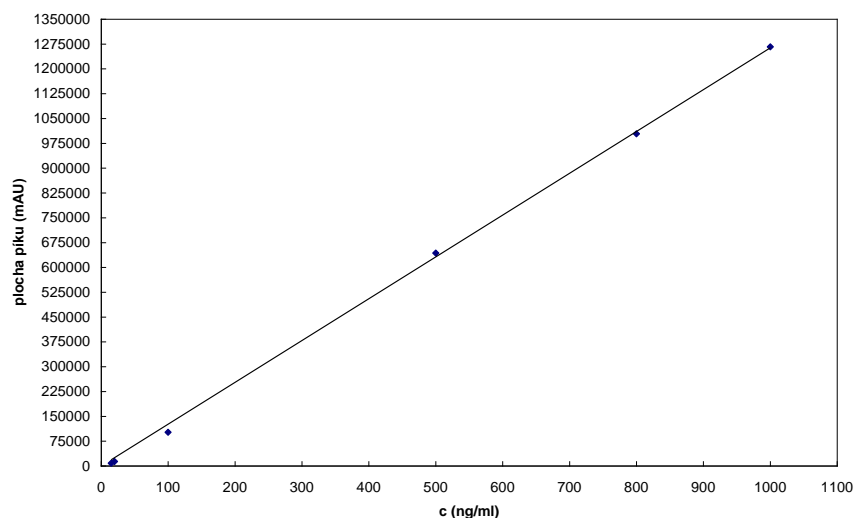
Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 3091,3x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9995$ . Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu 7,63 ng·l<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti 25,42 ng·l<sup>-1</sup>.



**Graf 9: Kalibrace - estron**

#### 4.3.2 Kalibrační závislost $\alpha$ -estradiolu

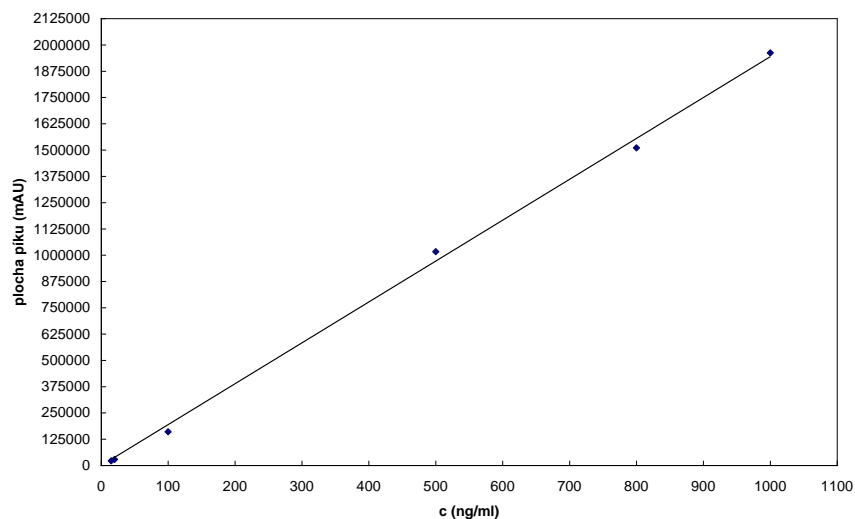
Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 1263,7x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9993$ . Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu  $16,88 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $56,25 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Graf 10: Kalibrace -  $\alpha$ -estradiol**

#### 4.3.3 Kalibrační závislost $\beta$ -estradiolu

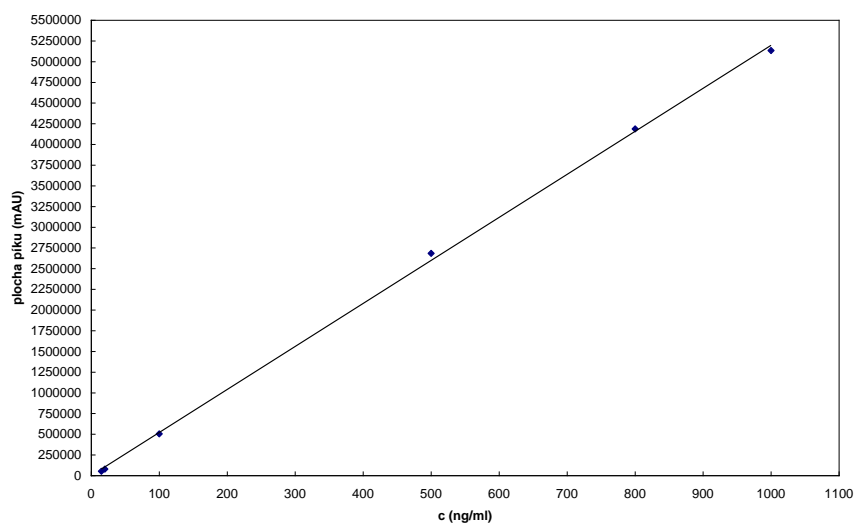
Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 1944,5x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9984$ . Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu  $9,64 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $32,14 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Graf 11: Kalibrace - β-estradiol**

#### 4.3.4 Kalibrační závislost estriolu

Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 5197,8x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9995$ . Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu  $3,46 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $11,54 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

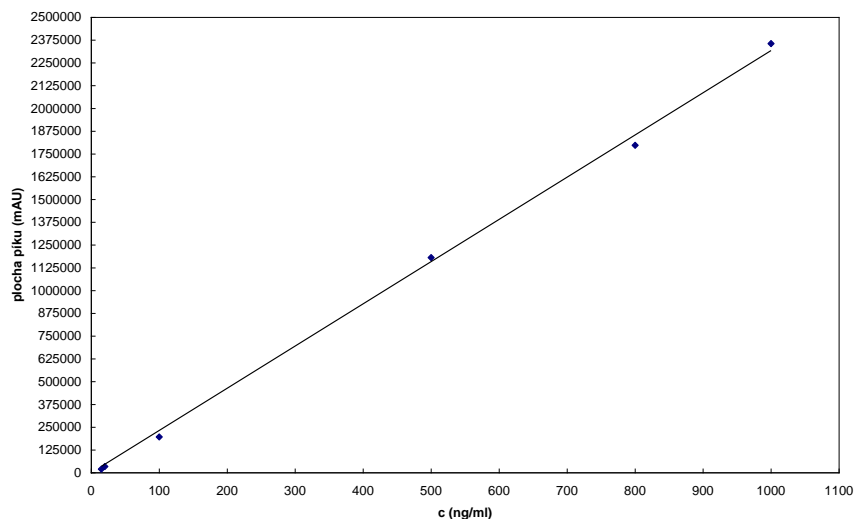


**Graf 12: Kalibrace - estriol**

#### 4.3.5 Kalibrační závislost ethinylestradiolu

Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 2317,7x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9987$ . Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu  $9,64 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $32,14 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

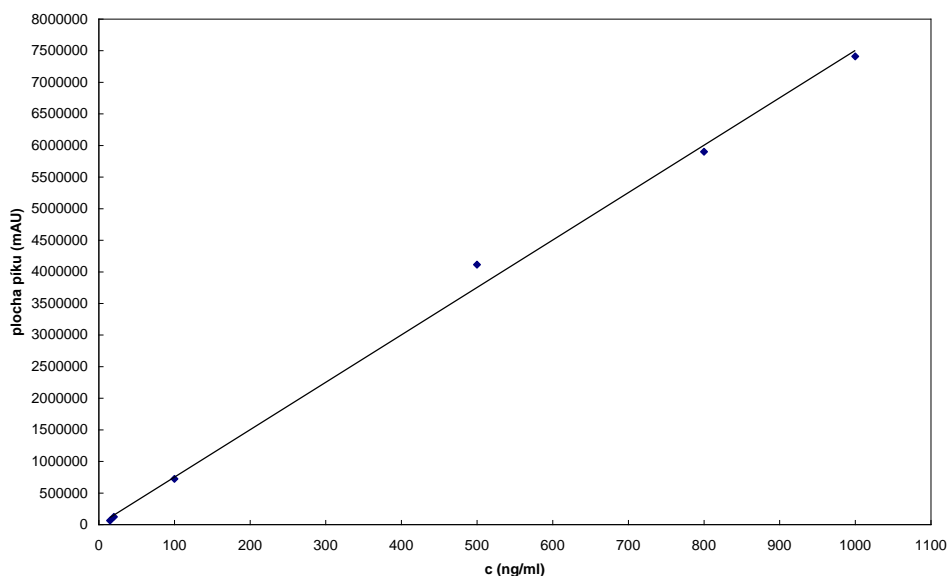




**Graf 13: Kalibrace - ethinylestradiol**

#### 4.3.6 Kalibrační závislost diethylstilbestrolu

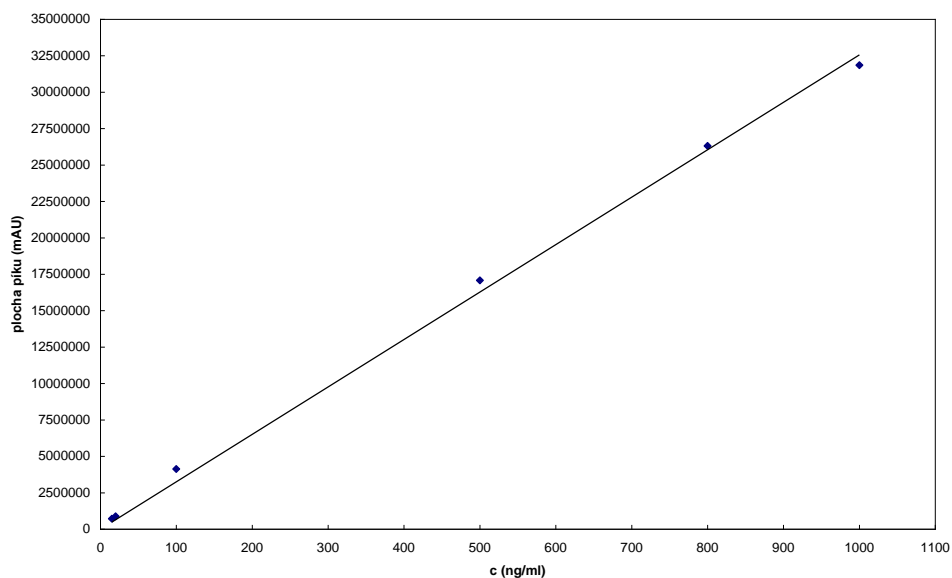
Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 7503,3x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9970$ . Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu  $10,59 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $35,29 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Graf 14: Kalibrace - diethylstilbestrol**

#### 4.3.7 Kalibrační závislost progesteronu

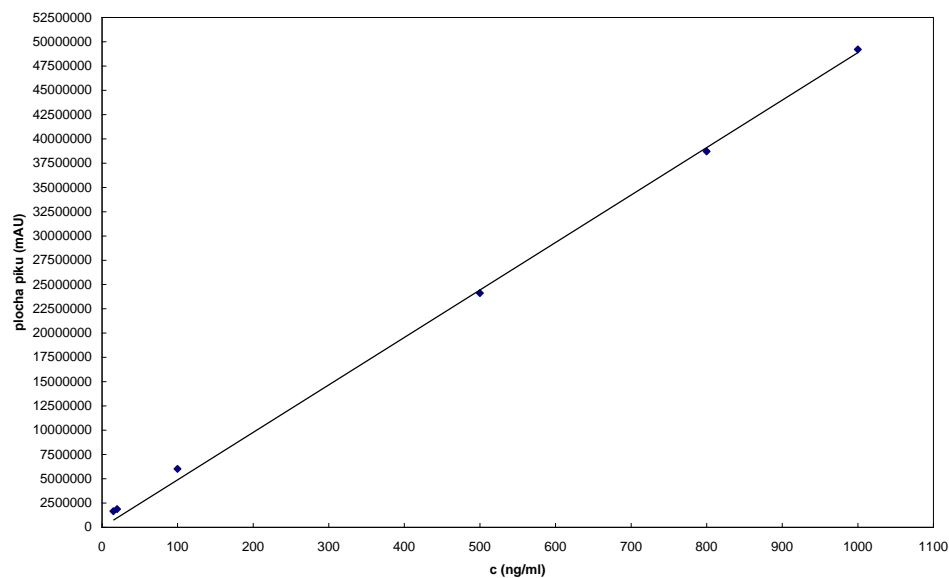
Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 32561x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9978$ . Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu  $6,26 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $20,87 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Graf 15: Kalibrace - progesteron**

#### 4.3.8 Kalibrační závislost norethindronu

Kalibrační závislost byla vytvořena pomocí programu MS Excel. Rovnice regrese:  $y = 48876x$ . Hodnota koeficientu determinace:  $R^2 = 0,9984$ . Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti dle výšky píku analytu a šumu. Vypočtená mez detekce estronu měla hodnotu  $2,84 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $9,47 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Graf 16: Kalibrace – norethindron**

**Tabulka 4: Tabulka s hodnotami LOD a LOQ pro POCIS**

Hormon	LOD (ng·l <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·l <sup>-1</sup> )
estron	7,63	25,42
α-estradiol	16,88	56,25
β-estradiol	9,64	32,14
estriol	3,46	11,54
ethinylestradiol	9,64	32,14
diethylstilbestrol	10,59	35,29
progesteron	6,26	20,87
norethindron	2,84	9,47

#### 4.4 Stanovení hormonů v reálných vzorcích

Vzorkování probíhalo ve dvou po sobě následujících cyklech. Pasivní vzorkovače byly z technologické linky úpravní vody odebrány vždy po čtyřech týdnech. První cyklus skončil dne 15. března 2013. Současně s pasivními vzorkovači byly odebrány bodové vzorky vody. Druhý cyklus skončil dne 26. dubna 2013. Opět byly současně s pasivními vzorkovači odebrány bodové vzorky vody.

Bodové vzorky vody byly zpracovány metodou SPE, kdy z každého odběrového místa byly připraveny tři paralelní vzorky. Pro výsledné výpočty byla použita průměrná hodnota.

Vzorkovače POCIS byly zpracovány výše uvedenou metodou. I zde byly z každého odběrového místa připraveny tři paralelní vzorky. Pro výsledné výpočty byla použita průměrná hodnota.

**Tabulka 5: Tabulka výsledků odběrů ze dne 15. března 2013**

Sledovaný estrogen	Koncentrace (ng.l <sup>-1</sup> )						
	Surová voda	Voda před flotací		Voda za flotací		Pitná voda	
	SPE	SPE	POCIS	SPE	POCIS	SPE	POCIS
estron	70,31	(48,94)	34,60	(48,57)	< LOD	< LOD	< LOD
α-estradiol	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
β-estradiol	(86,89)	(67,97)	(10,80)	(49,93)	< LOD	< LOD	< LOD
estriol	45,16	(22,62)	(11,64)	(20,46)	(3,71)	< LOD	< LOD
ethinylestradiol	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
diethylstilbestrol	(21,67)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
progesteron	(28,28)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
norethindron	(23,73)	(8,77)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Pozn.: Hodnoty v závorkách se nacházejí mezi LOD a LOQ. Odběr pitné vody probíhal z akumulační nádrže, kde je akumulována již kompletně upravená voda, která prošla celou technologickou linkou včetně hygienizace (chlorování).

**Tabulka 6: Tabulka výsledků odběrů ze dne 26. dubna 2013**

Sledovaný estrogen	Koncentrace (ng.l <sup>-1</sup> )						
	Surová voda	Voda před flotací		Voda za flotací		Pitná voda	
	SPE	SPE	POCIS	SPE	POCIS	SPE	POCIS
estron	(45,47)	(28,00)	< LOD	(25,28)	< LOD	< LOD	< LOD
α-estradiol	185,02	(104,64)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
β-estradiol	(45,40)	(39,71)	(13,49)	< LOD	(9,92)	< LOD	< LOD
estriol	41,08	(28,32)	(9,10)	(23,04)	(4,51)	(15,74)	< LOD
ethinylestradiol	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
diethylstilbestrol	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
progesteron	(48,27)	(24,41)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
norethindron	(26,80)	(18,77)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Pozn.: Hodnoty v závorkách se nacházejí mezi LOD a LOQ. Odběr pitné vody probíhal z akumulační nádrže, kde je akumulována již kompletně upravená voda, která prošla celou technologickou linkou včetně hygienizace (chlorování).

#### 4.4.1 Surová voda

Koncentrace sledovaných hormonů v surové vodě byla vyhodnocena pomocí výše uvedených kalibračních závislostí. Vzorky surové vody byly odebírány pouze bodovými odběry.

Z přiložené tabulky je patrné, že v surové vodě byly detekovány následující hormony: estron (E1), estriol (E3), α-estradiol (α-E2), β-estradiol (β-E2), diethylstilbestrol (DES), progesteron (PROG) a norethindron (NOR), avšak β-E2, DES, PROG a NOR byly v koncentracích pod mezí stanovitelnosti.

Koncentrace estronu byla v odběru z 15. 3. 70,31 ng.l<sup>-1</sup>, v odběru z 26. 4. byla hodnota koncentrace pod mezí stanovitelnosti.

Hormon α-estradiolu byl detekován pouze v odběru z 26. 4. a to v koncentraci 185,02 ng.l<sup>-1</sup>.

V obou dvou odběrech byl detekován estriol. V odběru z 15. 3. v koncentraci 45,16 ng.l<sup>-1</sup> a v odběru z 26. 4. v koncentraci 41,08 ng.l<sup>-1</sup>.

Detekce estriolu je důsledkem transformací estrogenů v těle lidí i zvířat, neboť tento hormon je konečným produktem těchto transformací a tudíž hlavním vylučovaným estrogenem. Další detekovaný hormon α-estradiolu je naopak hlavním hormonem dospělých žen, je tedy vylučován velkou částí populace a lze tedy předpokládat, že může dojít k jeho detekci ve vodách. Podobné je to s estronem [41].

Všechny stanovitelné hormony mohou být přírodního původu, neboť se přirozeně nacházejí v lidském těle a s výjimkou estronu i v těle zvířat. Do nádrže a tedy i surové vody se tyto hormony mohly dostat vodními přítoky.

Poslední sledovaný hormon ethinylestradiol (EE2) nebyl detekován vůbec.

#### 4.4.2 Před flotační linkou

Koncentrace sledovaných hormonů ve vodě před flotační linkou byla vyhodnocena pomocí výše uvedených kalibračních závislostí. Vzorky této vody byly odebírány jak bodovými odběry, tak za využití pasivního vzorkovače.

Z přiložené tabulky je patrné, že ve vzorcích vody před flotací byly detekovány estron, estriol,  $\alpha$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol, progesteron a norethindron, avšak kromě estronu byly všechny hodnoty v koncentracích pod mezí stanovitelnosti.

Estron byl detekován a kvantifikován pouze v odběru z 15. 3. z pasivního vzorkovače a to v koncentraci  $34,60 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Dále bylo před flotační linkou detekováno i větší množství  $\alpha$ -estradiol ( $104,64 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ), ačkoliv bylo pod mezí stanovitelnosti. Zbylé detekované hormony byly nalezeny i ve vzorcích surové vody, a protože před flotační linkou dochází pouze k nadávkování koagulantu, ale k žádnému jinému kroku úpravy vody, lze konstatovat, že samotné nadávkování koagulantu hormony z vody zcela neodstraňuje.

Hormony ethinylestradiol, diethylstilbestrol nebyly detekovány vůbec.

#### 4.4.3 Za flotační linkou

Koncentrace sledovaných hormonů ve vodě za flotační linkou byla vyhodnocena pomocí výše uvedených kalibračních závislostí. Vzorky této vody byly odebírány jak bodovými odběry, tak za využití pasivního vzorkovače.

Z přiložené tabulky je patrné, že ve vzorcích vody před flotací byly detekovány estron, estriol,  $\alpha$ -estradiol a  $\beta$ -estradiol, avšak všechny hodnoty koncentrací byly pod mezí stanovitelnosti.

Po úpravě vody koagulací, došlo k odstranění většiny hormonů, což je plně v souladu s faktem, že koagulací se dobře odstraňují látky ve vodě špatně rozpustné, jimiž estrogeny jsou. Všechny detekované látky byly v koncentracích menších než byly detekované v surové vodě, případně ve vodě před flotací.

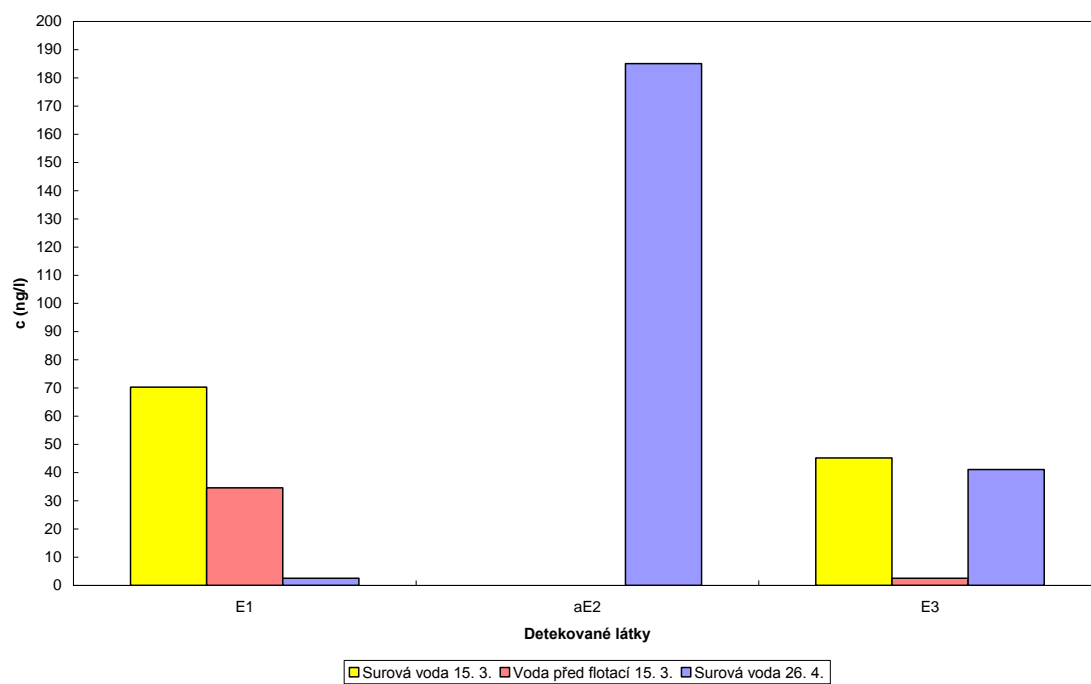
Zbylé hormony – ethinylestradiol, diethylstilbestrol, progesteron a norethindron – nebyly detekovány vůbec.

#### 4.4.4 Pitná voda

V akumulární nádrži s pitnou vodou byl detekován pouze estriol ve vzorku při odběru 26. dubna, avšak jeho koncentrace byla pod mezí stanovitelnosti. Ostatní hormony nebyly detekovány v pitné vodě vůbec.

Tento výsledek je v souladu se studií zpracovanou Státním zdravotním ústavem [100], která se zabývala plošným screeningem humánních léčiv v pitné vodě. V případě estrogenů nebyl zaznamenán v žádném odběrovém místě nález nad mezí stanovitelnosti.

Pitná voda byla odebírána z akumulární nádrže, kde je akumulována již kompletně upravená voda, tzn. i po hygienizaci. Hygienizace probíhá chlorováním a lze tedy konstatovat, že je to metoda poměrně účinná na odstranění velké části sledovaných látek, ovšem vzhledem k mezím detekce a stanovitelnosti publikovanými v této práci nelze s jistotou říci, že v pitné vodě nejsou zcela jistě estrogeny přítomny.



**Graf 17: Grafické znázornění výsledků**

## 5 ZÁVĚR

Tématem diplomové práce bylo využití pasivního vzorkování při analýze hormonů v pitných vodách.

V teoretické části práce byla zpracována rešerše zaměřená na negativní dopady přítomnosti látek s hormonálními účinky na živé organismy a na možnosti jejich analytického stanovení ve vodách. Dále byla věnována pozornost možnosti využití pasivních vzorkovačů.

Na základě poznatků získaných z literární rešerše byla zpracována experimentální část práce. Sledovanými estrogeny byly estriol,  $\alpha$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol, ethinylestradiol, estron, diethylstilbestrol, progesteron a norethindron. V důsledku neuspokojivých mezí detekce nebyl mezi sledované estrogeny zařazen mestranol. Byla navržena a optimalizována analytická metoda pro stanovení těchto látek v povrchových a v pitných vodách, která byla následně použita pro analýzu reálných vzorků odebraných na zvolené úpravě vody v České republice.

Vzorky byly odebírány na čtyřech místech technologické linky úpravy, a to na přítoku surové vody – pouze bodový odběr, před flotační linkou, za flotační linkou a v akumulární nádrži – odběry bodové i vzorkování vzorkovačem POCIS.

Pro izolaci sledovaných estrogenů z bodových vzorků byla využita metoda SPE. Průměrná výtěžnost pro jednotlivé hormony byla: estriol 80,61 %,  $\alpha$ -estradiol 76,98 %,  $\beta$ -estradiol 79,46 %, ethinylestradiol 89,07 %, estron 74,48 %, diethylstilbestrol 97,63 %, progesteron 81,63 % a norethindron 86,07 %.

Ve vzorcích vody byly identifikovány a kvantifikovány následující hormony: estriol, estron a  $\alpha$ -estradiol. Dále byly ve vodě nalezeny  $\beta$ -estradiol, diethylstilbestrol, progesteron a norethindron ovšem v množství pod mezí stanovitelnosti. Hormon ethinylestradiol nebyl detekován vůbec.

Estriol byl detekován v surové vodě v obou odběrech o koncentraci  $45,16 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $41,08 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ , na dalších místech byl detekován pouze pod mezí stanovitelnosti.

Estron byl detekován v surové vodě v jednom odběru o koncentraci  $70,31 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a dále před flotační linkou v pasivním vzorkovači o koncentraci  $34,60 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Hormon  $\alpha$ -estradiol byl detekován pouze v surové vodě v jednom odběru o koncentraci  $185,02 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Z práce vyplývá, že povrchová a pitná voda ze sledované úpravy vody není kontaminována velkým množstvím sledovaných látek. Ačkoliv zřejmě do nádrže přitéká voda těmito estrogeny kontaminována, vzhledem k fyzikálně-chemickým vlastnostem sledovaných látek lze předpokládat, že se mohou spíše než ve vodě kumulovat v sedimentech. V pitné vodě nebyly, kromě jednoho odběru, estrogeny detekovány. Současná technologická linka pracuje tedy dobře, ovšem vzhledem k mezím detekce a stanovitelnosti dosaženými v této práci nelze s jistotou říci, že v pitné vodě určitě nejsou estrogeny přítomny.

Výsledky diplomové práce jsou v souladu s publikovanými pracemi a prokázaly velmi nízký výskyt estrogenních hormonů v povrchové a v pitné vodě na sledované úpravě vody.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SEETHAPATHY, Suresh, Tadeusz GÓRECKI, Xiaojing LI: Passive Sampling in environmental analysis. *Journal of Chromatography*. 2008, vol. 1184, no. 1-2, s. 234-253. [online] [cit. 2012-10-09].
- [2] VRANA, Branislav, B. JAROSOVA, L. BLAHA, T. RANDAK, R. GRABIC, J.P. GIESY a K. HILSCHEROVA: Passive Sampling Techniques for Monitoring Pollutants in Water. *Trends in Analytical Chemistry*. 2005, vol. 24, no. 10, s. 845-868. [online] [cit. 2012-10-04].
- [3] VÍTKOVÁ, Libuše. *Pasivní vzorkování polárních organických kontaminantů z vod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 58 s. Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc. [online]. [cit. 2012-10-10]. Dostupné z WWW: [https://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?action=detail&zp\\_id=24436&rok=&typ=2&jazyk=&text=V%C3%ADtkov%C3%A1&hl\\_klic\\_slova=1&hl\\_abstrakt=0&hl\\_nazev=0&hl\\_autor=1&str=1](https://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?action=detail&zp_id=24436&rok=&typ=2&jazyk=&text=V%C3%ADtkov%C3%A1&hl_klic_slova=1&hl_abstrakt=0&hl_nazev=0&hl_autor=1&str=1)
- [4] JANKŮ, Josef, Jiří ČERMÁK. *Vzorkování odpadů*. [online]. [cit. 2012-10-28]. Dostupné z WWW: [http://www.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/vzorkovani/Vzorkovani\\_070104\\_4.pdf](http://www.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/vzorkovani/Vzorkovani_070104_4.pdf)
- [5] SODERGREN, A. SOLVENT-FILLED DIALYSIS MEMBRANES SIMULATE UPTAKE OF POLLUTANTS BY AQUATIC ORGANISMS. *Environmental science and technology* [online]. Washington: American Chemical Society, 1987, roč. 21, č. 9, s. 855-859 [cit. 2013-04-29]. ISSN 0013-936x.
- [6] ČÁSLAVSKÝ, Josef. Využití pasivního vzorkování při analýze vody. In: *Pitná voda 2012: Pitná voda z úrodných nádrží*. České Budějovice: Tiskárna Josef Posekaný, 2012, s. 227-232. ISBN 978-80-905238-0-7.
- [7] KWON, Jung-Hwan, Min-Ji KIM a Su-Jin KIM. Development of a new time-integrative sampler using in situ solvent extraction. *Chemosphere*. 2012, č. 86, s. 190-197. [online]. [cit. 2012-11-22].
- [8] PROKEŠ, Roman. *Využití pasivních vzorkovačů pro měření kontaminace povrchových vod*. Brno: Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká, 2006. 112 s. Vedoucí diplomové práce: Mgr. Ing. Jiří Kohoutek. [online]. [cit. 2012-10-17]. Dostupné z WWW: [http://is.muni.cz/th/63848/prif\\_m](http://is.muni.cz/th/63848/prif_m)
- [9] SÖDERSTRÖM, Hanna, Richard H. LINDBERG a Jerker FICK. Strategies for monitoring the emerging polar organic contaminants in water with emphasis on integrative passive sampling. *Journal of Chromatography A*. 2009, č. 1216, s. 623-630. [online]. [cit. 2012-11-23].
- [10] BELARDI, P. Robert a Janusz B. PAWLISZYN: The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibers in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and their Rapid Transfer to Capillary Columns. *Water Pollution Research Journal of Canada* [online]. 1989, roč. 24, č. 1, s. 179-191 [cit. 2013-01-24].



- [11] FUSEK, Martin. Nový vstřikový ventil kombinující Solid Phase Microextraction (SPME) s HPLC. *Chemické listy*. [online]. [cit. 2012-10-17]. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin272/fusek.html>
- [12] Springer.com. *SpringerImages* [online]. 2012 [cit. 2012-10-30]. Dostupné z: [http://www.springerimages.com/Images/Chemistry/1-10.1365\\_s10337-008-0937-3-17](http://www.springerimages.com/Images/Chemistry/1-10.1365_s10337-008-0937-3-17)
- [13] BALTUSSEN, E., P. SANDRA, F. DAVID a C. CRAMERS. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *The journal of microcolumn separations: JMS* [online]. 1999, roč. 11, č. 10, s. 737-747 [cit. 2013-04-19]. ISSN 1040-7685.
- [14] L.L. TAN, Benjamin, Darryl W. HAWKER, Jochen F. MÜLLER, Louis A. TREMBLAY a Heather F. CHAPMAN. Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography–mass spectrometry. *WATER RESEARCH*. 2008, roč. 48, s. 404-412. [online]. [cit. 2012-10-28].
- [15] SBSE Twister. In: *Wikimedia Commons* [online]. 2010 [cit. 2012-11-04]. Dostupné z: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:SBSE\\_Twister\\_de.svg?uselang=cs](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:SBSE_Twister_de.svg?uselang=cs)
- [16] HUCKINS, James N., Mark W. TUBERGEN a Gamini K. MANUWEERA. Semipermeable membrane devices containing model lipid: A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* [online]. 1990, roč. 20, č. 5, s. 533-552 [cit. 2013-04-19].
- [17] GILLI, G., T. SCHILIRÓ, C. PIGNATA, D. TRAVERSI, E. CARRARO, C. BAIOCCHI, R. AIGOTTI, D. GIACOSA a E. FEA. Application of semipermeable membrane device for assessing toxicity in drinking water. *Chemosphere*. 2005, roč. 61, s. 1691-1699. [online]. [cit. 2012-10-30].
- [18] LITTEN, Simon, Berton MEAD a John HASSETT. Application of passive samplers (piscis) to locating a source of PCBs on the Black River, New York. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 1993, roč. 12, č. 4, s. 639-647 [cit. 2013-04-19]. ISSN 07307268. DOI: 10.1002/etc.5620120405.
- [19] BROWN, DelShawn L. Use of Passive Samplers to Evaluate Pharmaceutical Fate in Surface Waters. *University of Nebraska*, 2010. [online]. [cit. 2012-10-27]. Dostupné z: [http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1005&context=civilengdiss&sei-redir=1&referer=http%3A%2F%2Fwww.google.cz%2Furl%3Fsa%3Dt%26rct%3Dj%26q%3Dpassive%2520in-situ%2520concentration%2520extraction%2520sampler%26source%3Dweb%26cd%3D2%26ved%3D0CDAQFjAB%26url%3Dhttp%253A%252F%252Fdigitalcommons.unl.edu%252Fcgi%252Fviewcontent.cgi%253Farticle%253D1005%2526context%253Dcivilengdiss%26ei%3DvEOdUKKDMZCSswaG\\_YCoDQ%26usq%3DAFQjCNHUBhVjMNsab98AJwh-99uT7QY94Q#search=%22passive%20in-situ%20](http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1005&context=civilengdiss&sei-redir=1&referer=http%3A%2F%2Fwww.google.cz%2Furl%3Fsa%3Dt%26rct%3Dj%26q%3Dpassive%2520in-situ%2520concentration%2520extraction%2520sampler%26source%3Dweb%26cd%3D2%26ved%3D0CDAQFjAB%26url%3Dhttp%253A%252F%252Fdigitalcommons.unl.edu%252Fcgi%252Fviewcontent.cgi%253Farticle%253D1005%2526context%253Dcivilengdiss%26ei%3DvEOdUKKDMZCSswaG_YCoDQ%26usq%3DAFQjCNHUBhVjMNsab98AJwh-99uT7QY94Q#search=%22passive%20in-situ%20). Master thesis. University of Nebraska. Vedoucí práce Professor Shannon Bartelt-Hunt.

[20] KOT, Agata, Božena ZABIEGALA, Jacek NAMIEŚNIK: Passive sampling for long-term monitoring of organic pollutants in water. *Trends in analytical chemistry* [online]. 2000, roč. 19, č. 7, s. 446-459 [cit. 2012-11-04].

[21] VRANA, Branislav, Peter POPP, Albrecht PASCHE a Gerrit SCHÜÜMANN. Membrane-Enclosed Sorptive Coating. An Integrative Passive Sampler for Monitoring Organic Contaminants in Water. *Analytical Chemistry* [online]. 2001, roč. 73, č. 21, s. 5191-5200 [cit. 2013-01-24].

[22] VRANA, Branislav, Albrecht PASCHKE a Peter POPP. Calibration and field performance of membrane-enclosed sorptive coating for integrative passive sampling of persistent organic pollutants in water. *Environmental Pollution*. 2006, roč. 144, s. 296-307. . [online]. [cit. 2012-10-17].

[23] PASCHKE, A. a P. POPP. Solid-phase microextraction fibre-water distribution constants of more hydrophobic organic compounds and their correlations with octanol-water partition coefficients. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, roč. 999, 1-2, s. 35-42 [cit. 2013-04-20]. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00538-7.

[24] VRANA, Branislav, Peter POPP, Albrecht PASCHKE a Gerrit SCHÜÜRMANN. Membrane-Enclosed Sorptive Coating. An Integrative Passive Sampler for Monitoring Organic Contaminants in Water. *Analytical Chemistry*[online]. 1999, roč. 71, č. 11 [cit. 2013-04-20]. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac010630z.

[25] WENNRICH, Luise, Branislav VRANA, Peter POPP a Wilhelm LORENZ. Development of an integrative passive sampler for the monitoring of organic water pollutants. *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2003, roč. 5, č. 5, s. 813-822 [cit. 2013-04-20]. ISSN 1464-0325. DOI: 10.1039/b303497f.

[26] KINGSTON, Jenny K., Richard GREENWOOD, Graham A. MILLS, Gregory M. MORRISON a Lena B. PERSSON. Development of a novel passive sampling system for the time-averaged measurement of a range of organic pollutants in aquatic environments. *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2000, roč. 2, č. 5, s. 487-495 [cit. 2013-04-20]. ISSN 14640325. DOI: 10.1039/b003532g.

[27] VRANA, Branislav, Graham A. MILLS, Ewa DOMINIAK a Richard GREENWOOD:  
Calibration of the Chemcatcher passive sampler for the monitoring of priority organic pollutants in water. *Environmental Pollution*. 2006, vol. 142, s. 333-343. [online]. [cit. 2012-10-04].

[28] DAVISON, W. a H. ZHANK. In-situ speciation measurements of trace components in natural-waters using thin-film gels. *Nature: the international weekly journal of science* [online]. London: Nature Publishing Group, 1994, roč. 367, č. 6463, s. 546-548 [cit. 2013-04-19]. ISSN 0028-0836.

[29] WARNKEN, Kert W., Hao ZHANG a William DAVISON. Chapter 11 In situ monitoring and dynamic speciation measurements in solution using DGT. *Comprehensive Analytical Chemistry* [online]. 2007, č. 58, s. 251-278 [cit. 2012-12-11].

- [30] MOLÍN, Radomír, Rudolf PŘIBIL. Pasivní dozimetrie. *Chemické listy*. 1998, vol. 92, s. 784-788. [online]. [cit. 2012-10-09].  
Dostupné z WWW: [www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998\\_10\\_784-788.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_10_784-788.pdf)
- [31] ADDECK, Arm, Kim CROES, Kersten VAN LANGENHOVE, Michael DENISON, Marc ELSKENS a Willy BAEYENS: Dioxin analysis in water by using a passive sampler and CALUX bioassay. *Talanta* [online]. 2012, roč. 88, s. 73-78 [cit. 2012-11-04].
- [32] ALVAREZ, D. A, P.E. STACKELBERG, J.D. PETTY, J.N. HUCKINS, E.T. FURLONG, S.D. ZAUGG a M.T. MEYER: Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream. *Chemosphere* [online]. 2005, roč. 61, č. 5, s. 610-622 [cit. 2012-11-04].
- [33] ALVAREZ, David A., Jimmie D. PETTY, James N. HUCKINS, Tammy L. JONES-LEPP, Dominic T. GETTING, Jon P. GODDARD a Stanley E. MANAHAN. Development of passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2004, roč. 23, č. 7, s. 1640- [cit. 2013-04-29]. ISSN 0730-7268. DOI: 10.1897/03-603.
- [34] C.E. Instruments. *C.E. Instruments Thailand* [online]. 2010 [cit. 2012-11-09].  
Dostupné z:  
<http://www.cethailand.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=538666956&Ntype=32>
- [35] MORIN, Nicolas, Cécile MIÉGE, Jérôme RANDON a Marina COQUERY. Chemical calibration, performace, validation and applications of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in aquatic environments. *Trends in Analytical Chemistry*. 2012, roč. 36. . [online]. [cit. 2012-11-09].
- [36] KOČÍ, Vladimír, Roman GRABIC: Vzorkování stopových koncentrací rizikových látek ve vodárenské praxi. *Sborník konference Pitná voda 2008*, s. 89-94. W&ET Team, České Budějovice 2008. ISBN 978-80-254-2034-8
- [37] Product: POCIS and its Deployment. *Environmental Sampling Technologies* [online]. 2012 [cit. 2012-11-09]. Dostupné z: <http://www.est-lab.com/pocis.php>
- [38] LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 320 s. ISBN 978-802-4725-260.
- [39] BOROVSANÝ, Alois a Jozef CSÖLLEI. *Farmaceutická chemie: (farmakochemie)*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2007, 177 s. ISBN 978-80-7305-013-9.
- [40] HANČ, Oldřich a Zdeněk PÁDR. *HORMONY: Úvod do jejich chemie a biologie*. Praha: Academia, 1982, 853 s.
- [41] KODÍČEK, Milan. *Hormony*. Praha. Vydavatelství VŠCHT Praha. [online]. 15. 9. 2011 [cit. 2012-11-26]. Dostupný z WWW: <[www.vydavatelstvi.vscht.cz](http://www.vydavatelstvi.vscht.cz)>

- [42] CHARVÁT, Josef. *Steroidní hormony*. Praha: Zdravotnické nakladatelství v Praze, 1952.
- [43] SUČKOVÁ, Tereza. *Hormony a jejich přítomnost ve složkách životního prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 43 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [44] MAREK, Josef. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010, xxiv, 777 s. ISBN 978-802-4726-397.
- [45] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 790 s. ISBN 978-802-4730-684
- [46] MERKUNOVÁ, Alena a Miroslav OREL. *Anatomie a fyziologie člověka: pro humanitní obory*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2008, 302 s. Psyché (Grada). ISBN 978-802-4715-216.
- [47] WEISS, Petr. *Sexuologie* [online]. Vyd. 1. Praha: Grada, 2010, xiii, 724 s. [cit. 2012-12-03]. ISBN 978-802-4724-928. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=-oQJQWva5-4C&pg=PA69&dq=Androgeny&hl=cs&sa=X&ei=V1-8ULS4DcnEsgbzhIG4AQ&ved=0CDcQ6AEwAg#v=onepage&q=Androgeny&f=false>
- [48] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání* [online]. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. [cit. 2012-12-03]. ISBN 80-247-0836-1. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=YugXIU4WB4EC&pg=PA452&dq=Anabolika&hl=cs&sa=X&ei=x3a8UK9jxdWyBprNgOgG&ved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=Anabolika&f=false>
- [49] ROZTOČIL, Aleš. *Moderní gynekologie* [online]. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, xviii, 508 s. [cit. 2012-12-04]. ISBN 978-802-4728-322. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=iw1-i00lB0oC&pg=PA69&dq=gestageny&hl=cs&sa=X&ei=ve-9UJfjKsSJ4ATJz4GQAQ&ved=0CDQ6AEwAg#v=onepage&q=gestageny&f=false>
- [50] TERNES, Thomas A., Adriano JOSS: *Human pharmaceuticals, hormones and fragrances a challenge for urban water management* [online]. Repr. London: IWA Publ, 2006 [cit. 2013-01-24]. ISBN 18-433-9093-0. Dostupné z: [http://books.google.cz/books?id=X9Sb4mVGF-oC&pg=PA55&hl=cs&source=gbs\\_toc\\_r&cad=4#v=onepage&q&f=false](http://books.google.cz/books?id=X9Sb4mVGF-oC&pg=PA55&hl=cs&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false)
- [51] Velký lékařský slovník. *Slovníky.cz* [online]. 2008 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/>
- [52] *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* [online]. 2012 [cit. 2012-12-06]. Agents Classified by the IARC Monographs, volumes 1–101. Dostupné z WWW: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>.
- [53] *Potraty 2011* [online]. 2012 [cit. 2012-12-09]. ISBN 978-80-7280-979-0. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/category/edice/publikace/zdravotnicka-statistika>

- [54] SLEZÁKOVÁ, Lenka. *Ošetřovatelství v gynekologii a porodnictví*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 269 s., [8] s. barev. obr. příl. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3373-9.
- [55] KUJALOVÁ, Hana, Vladimír SÝKORA a Pavel PITTER. Látky s estrogením účinkem ve vodách. *Chem. Listy*. [online]. 2007, č. 101, s. 706-712. [cit. 2012-11-13]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_09\\_706-712.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_09_706-712.pdf)
- [56] KOTYZA, Jan, Petr SOUDEK, Zdeněk KAFKA a Tomáš VANĚK. Léčiva - "nový" environmentální polutant. *Chem. Listy* [online]. 2009, č. 103, s. 540-547 [cit. 2012-12-06]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_07\\_540-547.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_540-547.pdf)
- [57] LANGE, Iris G., Andreas DAXENBERGER, Bettina SCHIFFER, Hilda WITTERS, Dolores IBARRETA a Heindrich H. D. MEYER. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2002, č. 473, s. 27-37 [cit. 2012-11-13].
- [58] PAČES, T.: Ženské hormony v povrchových vodách, čistíčkách a pitné vodě v Praze. [online]. [cit. 2012-12-06]. Dostupné z: <http://www.eurofert.cz/news/zenske-hormony-v-povrchovych-vodach-cistickach-a-pitne-vode-v-praze/>
- [59] CARGOUËT, Maëlle, Daniel PERDIZ, Asmaa MOUATASSIM-SOUALI, Sara TAMISIER-KAROLAK a Yves LEVI. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment* [online]. 2004, č. 324, s. 55-66 [cit. 2012-11-13].
- [60] HUERTA-FONTELA, Maria, Maria TERESA GALCERAN a Francesc VANTURA. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research* [online]. 2011, č. 45, s. 1432-1442 [cit. 2012-11-13].
- [61] D. KIM, Sang, Jaeweon CHO, In S. KIM, Brett J. VANDERFORD a Shane A. SNYDER. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research* [online]. 2007, č. 41, s. 1013-1021 [cit. 2012-11-13].
- [62] BODZEK, Michal a Mariusz DUDZIAK. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Desalination* [online]. 2006, č. 198, s. 24-32 [cit. 2012-11-13].
- [63] KUSTER, Marina, Maria José LÓPEZ DE ALDA a Damiá BARCELÓ. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2004, roč. 23, 10-11 [cit. 2012-11-13].
- [64] GABET, Virginie, Cécile MIÉGE, Philippe BADOS a Marina COQUERY. Analysis of estrogens in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*. 2007, roč. 26, č. 11.
- [65] Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich* [online]. 2012 [cit. 2012-12-30]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>

- [66] SPE Cartridges. *Crawford Scientific* [online]. 2010 [cit. 2012-12-30]. Dostupné z: [http://www.crawfordscientific.com/Silicycle\\_SPE.htm](http://www.crawfordscientific.com/Silicycle_SPE.htm)
- [67] COUFAL, Pavel. Extrakce. *Univerzita Karlova v Praze: Přírodovědecká fakulta* [online]. 2004 [cit. 2012-12-30]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [68] HARWOOD, D. Tim a David J. HANDELSMAN. Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization. *Clinica Chimica Acta*. 2009, č. 78, s. 78-84.
- [69] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [70] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 236 s. ISBN 80-708-0227-8.
- [71] STOPFORTH, Adriana, Ben V. BURGER, Andrew M. CROUCH a Pat SANDRA. The analysis of estrone and 17 $\beta$ -estradiol by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography/ mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens. *Journal of Chromatography B*. 2007, č. 56, s. 156-164.
- [72] SIGGIA, Sidney a Robert A. DISHMAN. Analysis of Steroid Hormones Using High Resolution Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 1970, roč. 42, č. 11. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60293a049>
- [73] GOHLKE, R. S. Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Anal Chem*. 1959, roč. 31, s. 535-541
- [74] BARKER, James. *Mass spectrometry* [online]. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 1999, 509 s. [cit. 2013-01-25]. ISBN 04-719-6762-9. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=JDcDrH1UXt0C&pg=PA306&dq=gas+chromatography+and+mass+spectroscopy&hl=cs&sa=X&ei=TqQBUY7dCaWg4gS5nIGABg&ved=0CEMQ6AEwAg#v=onepage&q=gas%20chromatography%20and%20mass%20spectroscopy&f=false>
- [75] ČÁSLAVSKÝ, Josef. Pokroky v chromatografii a jejich využití při analýze vod Sborník konference Pitná voda 2010, s. 205-210. W&ET Team, Č. Budějovice 2010. ISBN 978-80-254-6854-8
- [76] ZÝKA, Jaroslav. A KOLEKTIV. *Analytická příručka: DÍL I*. Praha: SNTL, 1988
- [77] *Hmotnostní spektrometrie*. 2. dopl. vyd. Editor Jan Vřešťál. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 114 s. ISBN 80-210-2283-3
- [78] HOLČAPEK, Michal a Pavel JANDERA. SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (HPLC/MS). *Chemické Listy*. 1998, č. 92, s. 278-286. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998\\_04\\_278-286.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf)

- [79] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Analyzátory, ionizační techniky*. In Hmotnostní spektrometrie. Brno, [cit. 2012-12-20]. Dostupné z WWW: [www.fch.vutbr.cz](http://www.fch.vutbr.cz)
- [80] STEWARD, Ian I. Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation. *Spectrochimica Acta* [online]. 1999, č. 54, s. 1649-1695 [cit. 2013-01-25].
- [81] Electrospray Ionization. *Lamond Laboratory* [online]. 2010 [cit. 2013-01-25]. Dostupné z: <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php>
- [82] HUAN-WEN, Chen, Lai JIN-HU, Zhou YU-FEN, Huan YAN-FU, Li JIAN-QIANG, Zhang XIE, Wang ZHI-CHANG a Luo MING-BIAO. Instrumentation and Characterization of Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY* [online]. 2007, roč. 35, č. 8, s. 1233-1240 [cit. 2013-01-25].
- [83] Wikimedia Commons. *Wiki* [online]. 2012 [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apci.gif>
- [84] HOLČAPEK, Michal. Mass Spectrometry. Univerzita Pardubice [online]. 2007 [cit. 2012-12-30]. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/MS\\_exper\\_vyzkum\\_cast2](http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_exper_vyzkum_cast2)
- [85] MASS SPECTROMETRY RESOURCE: Quadrupole Ion Trap (QIT) Mass Analysis. *The University of Bristol, School of Chemistry* [online]. 2004 [cit. 2012-12-30]. Dostupné z: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/qit-massspec.html>
- [86] The Triplequad LC/MS. *The Interdepartmental Equipment Facility* [online]. 2009 [cit. 2012-12-16]. Dostupné z: <http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/triplequad.html.pdf>
- [87] Popis GC/MS-TOF. *Chromservis* [online]. 2010 [cit. 2012-12-30]. Dostupné z: <http://chromservis.cz/item/gc-ms-tof-description?lang=CZ>
- [88] MASS SPECTROMETRY RESOURCE: Time-of-Flight (TOF) Mass Analysis. *The University of Bristol, School of Chemistry* [online]. 2004 [cit. 2012-12-30]. Dostupné z: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tof-massspec.html>
- [89] Základy UPLC. *HPLC.cz* [online]. 2011 [cit. 2012-12-30]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/UPLC/index.htm>
- [90] ZHENG, Minggang, Ling WANG, Yuandui BI a Feng LIU. Improved method for analyzing the degradation of estrogens in water by solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Environmental Sciences*. 2011, č. 4, s. 693-698.
- [91] PEDROUZO, Marta, Francesc BORRULL, Eva POCURULL a Rosa Maria MARCÀ. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2009-06-15, roč. 78, 4-5, s. 1327-1331 [cit. 2013-03-25]. ISSN 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.02.005.

- [92] ISOBE, Shiraishi, Masaru YASUDA, SHINODA, Hiroshi SUZUKI a Masatoshi MORITA. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, č. 984, s. 195-202 [cit. 2013-03-25].
- [93] MATĚJÍČEK, David, Pavlína HOUSEROVÁ a Vlastimil KUBÁŇ. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, roč. 1171, 1-2, s. 80-89 [cit. 2013-03-25]. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.053.
- [94] JURASOVÁ, Lenka. *Stanovení vybraných hormonálních přípravků pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 95 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [95] ZHAO, Jian-Liang, Guang-Guo YING, Li WANG, Ji-Feng YANG, Xiao-Bing YANG, Li-Hua YANG a Xu LI. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. [online]. [cit. 2013-03-25]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.09.048.
- [96] *VODÁRENSKÉ KAPKY: Časopis VODÁRENSKÉ AKCIOVÉ SPOLEČNOSTI*, a. s. Brno, 2002, roč. 6, č. 2.
- [97] PubChem. PubChem [online]. 2010 [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [98] POJANA, Giulio, Angela BONFÀ, Francesco Busetti, Anna COLLARIN a Antonio MARCOMINI. Determination of natural and synthetic estrogenic compounds in coastal lagoon waters by HPLC-electrospray-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [online]. 2007, roč. 84, č. 10, s. 717-727 [cit. 2013-05-02]. ISSN 0306-7319. DOI: 10.1080/03067310410001729060.
- [99] MORIN, Nicolas, Julien CAMILLERY, Cécilie CREN-OLIVÉ, COQUERY a Cécilie MIÉGE. Determination of uptake kinetics and sampling rates for 56 organic micropollutants using “pharmaceutical” POCIS. *Talanta* [online]. 2013, č. 109, s. 61-73 [cit. 2013-05-10].
- [100] ČADEK, Václav, Hana JELIGOVÁ, František KOŽÍŠEK, Jana POMYKAČOVÁ a Veronika SVOBODOVÁ. Výskyt humánních léčiv v pitných vodách v České republice. *Státní zdravotní ústav* [online]. 2011 [cit. 2013-05-03]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/gacr\\_leciva/Vyskyt\\_leciv\\_v\\_pitne\\_vode\\_CR\\_zprava\\_na\\_www\\_szu\\_verze\\_4.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/gacr_leciva/Vyskyt_leciv_v_pitne_vode_CR_zprava_na_www_szu_verze_4.pdf)



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

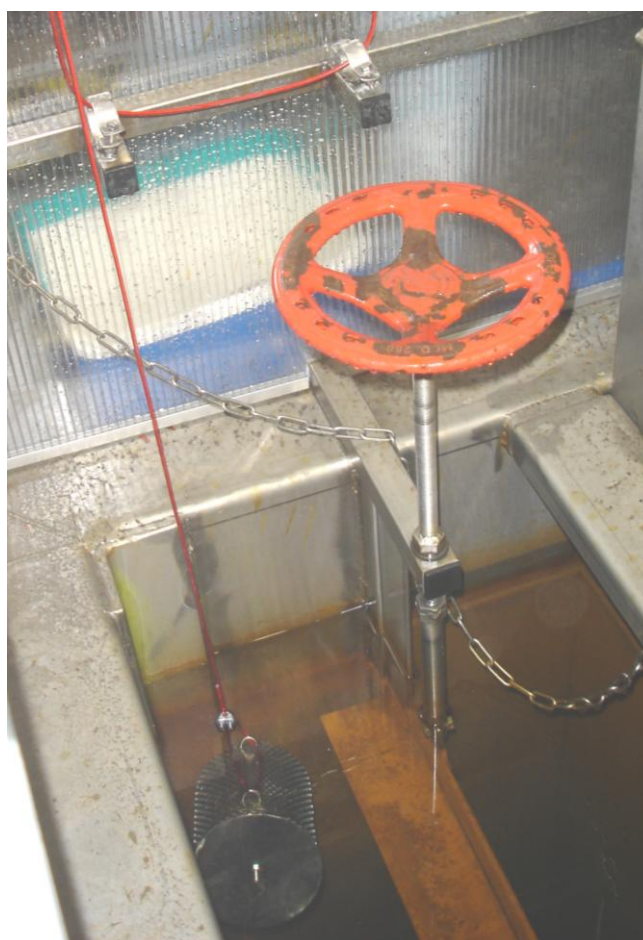
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
DES	diethylstilbestrol
DGT	Diffusive Gradient in Thin Films
$\alpha$ -E2	$\alpha$ -estradiol
$\beta$ -E2	$\beta$ -estradiol
E1	estron
E3	estriol
EE2	ethinylestradiol
ESI	elektrosprej (Electrospray Ionization)
GC	plynový chromatograf, plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research of Cancer)
K <sub>ow</sub>	rozdělovací koeficient oktanol-voda
LOD	mez detekce (Limit of Detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)
MES	mestranol
MESCO	Membrane Enclosed Sorptive Coating Sampler
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NOR	norethindron
PDMS	polydimethylsiloxan
PISCES	Passive In-Situ Concentration Extraction Sampler
POCIS	Polar Organic Chemical Integrative Sampler
PROG	progesteron
Q	kvadrupól (Quadrupole)
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SPE	extrakce na tuhou fázi
SPMD	Semi-Permeable Membrane Device
SPME	Solid Phase Microextraction
TOF	Time Of Flight (analyzátor doby letu)
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (Ultra Performance Liquid Chromatography)
UV	ultrafialová oblast záření
3D-IT	sférická iontová past (3D-Iont Trap)

## 8 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Umístění vzorkovačů na úpravnu vody



**Obr. 37: Umístění pasivního vzorkovače před flotační linku**

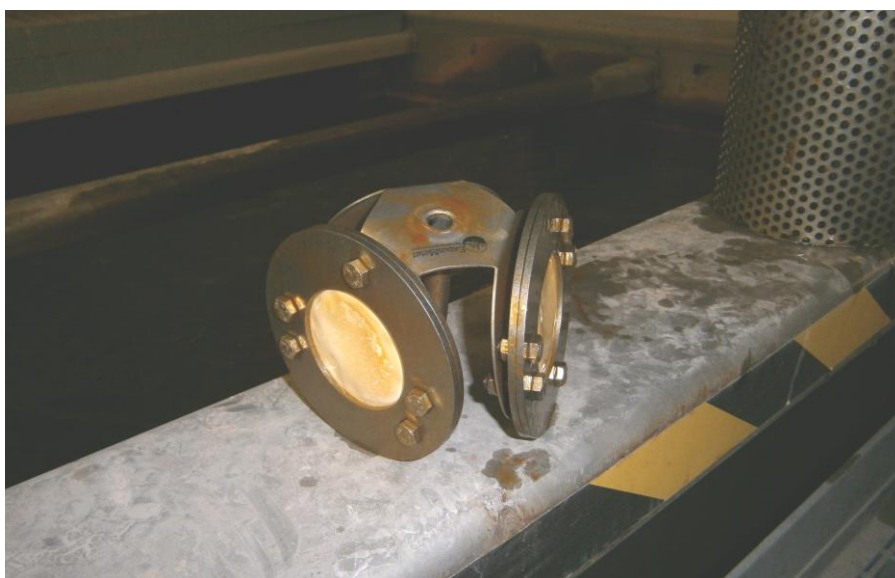


**Obr. 38: Umístění pasivního vzorkovače za flotační linku**

Příloha č. 2: Odběr vzorkovačů z úpravy vody



**Obr. 39: Odběr pasivního vzorkovače před flotační linkou**



**Obr. 40: Disky vzorkovače POCIS po expozici**



**Obr. 41: Pasivní vzorkovač po expozici v akumulční nádrži**

Příloha č. 3: Zpracování vzorkovačů POCIS; LC/MS



**Obr. 42: Zpracování sorbentu z pasivního vzorkovače**



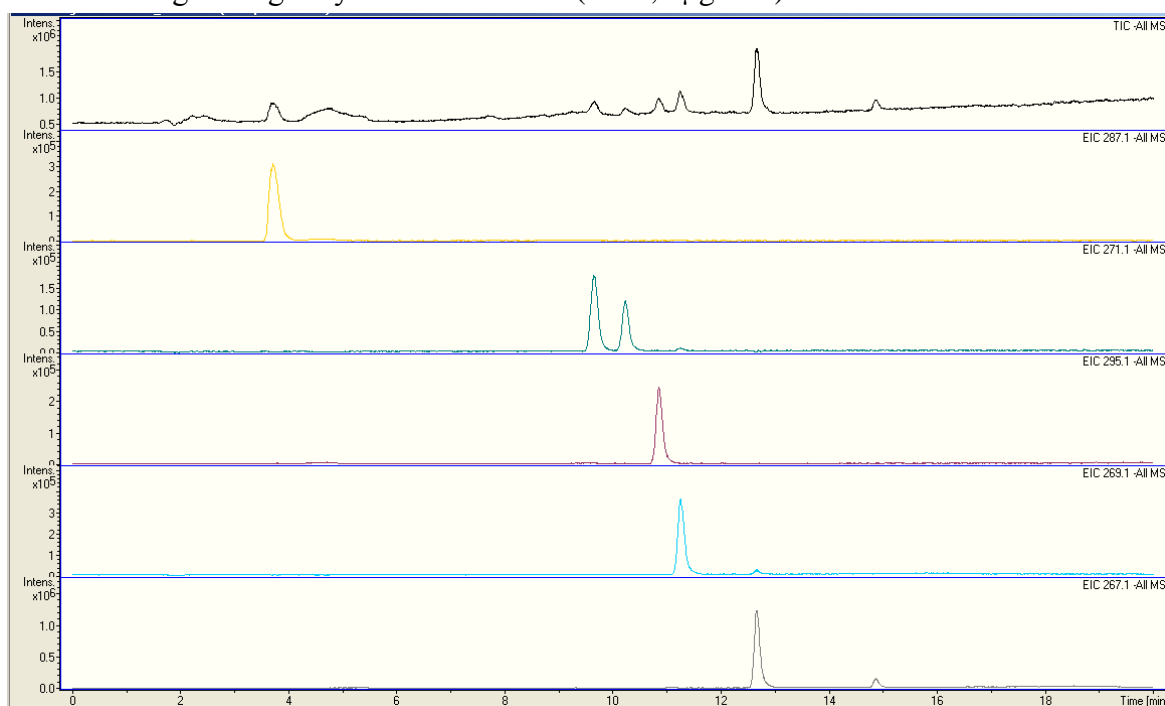


**Obr. 43: Eluce sorbentu z POCIS**

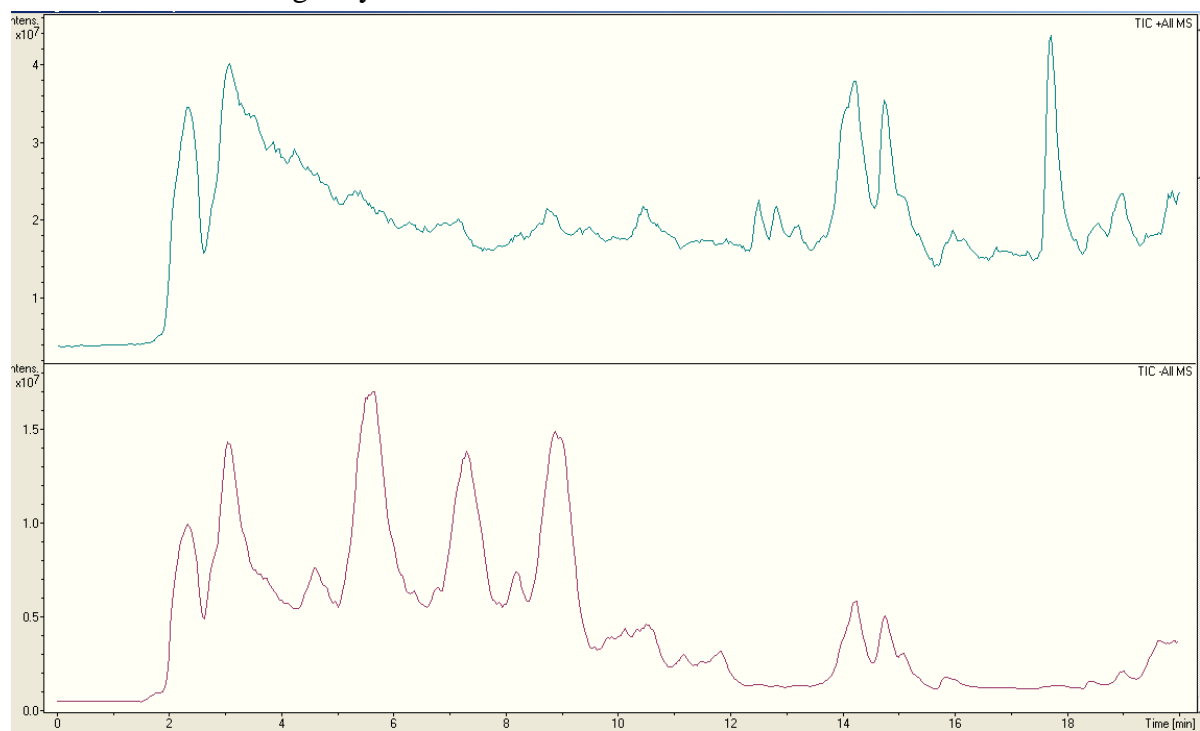


**Obr. 44: Přístroj LC/MS**

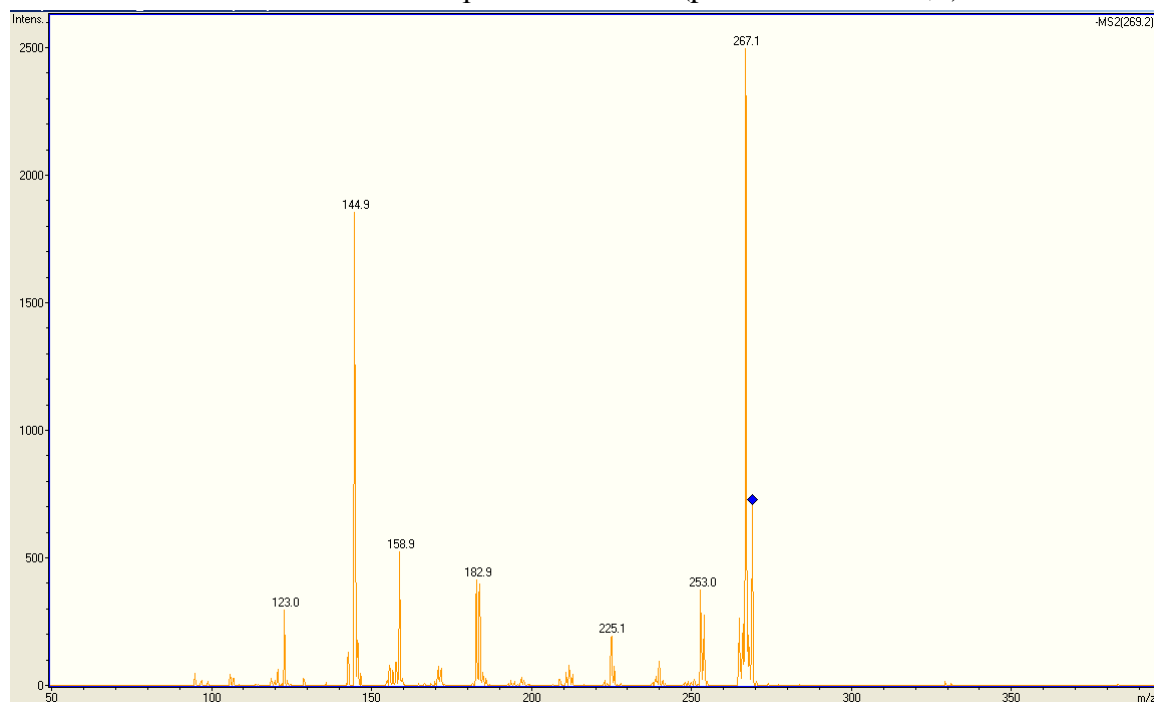
Příloha č. 4: Fragmentogramy kalibrační směsi ( $c = 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )



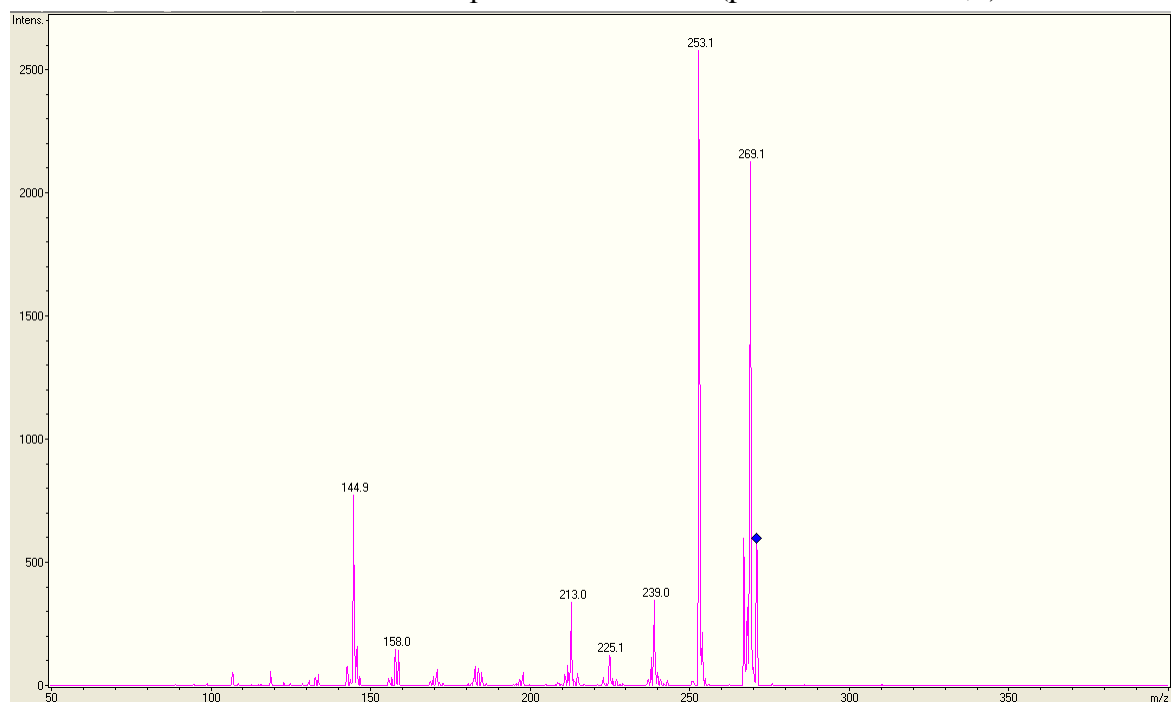
Příloha č. 5: Chromatogramy reálného vzorku



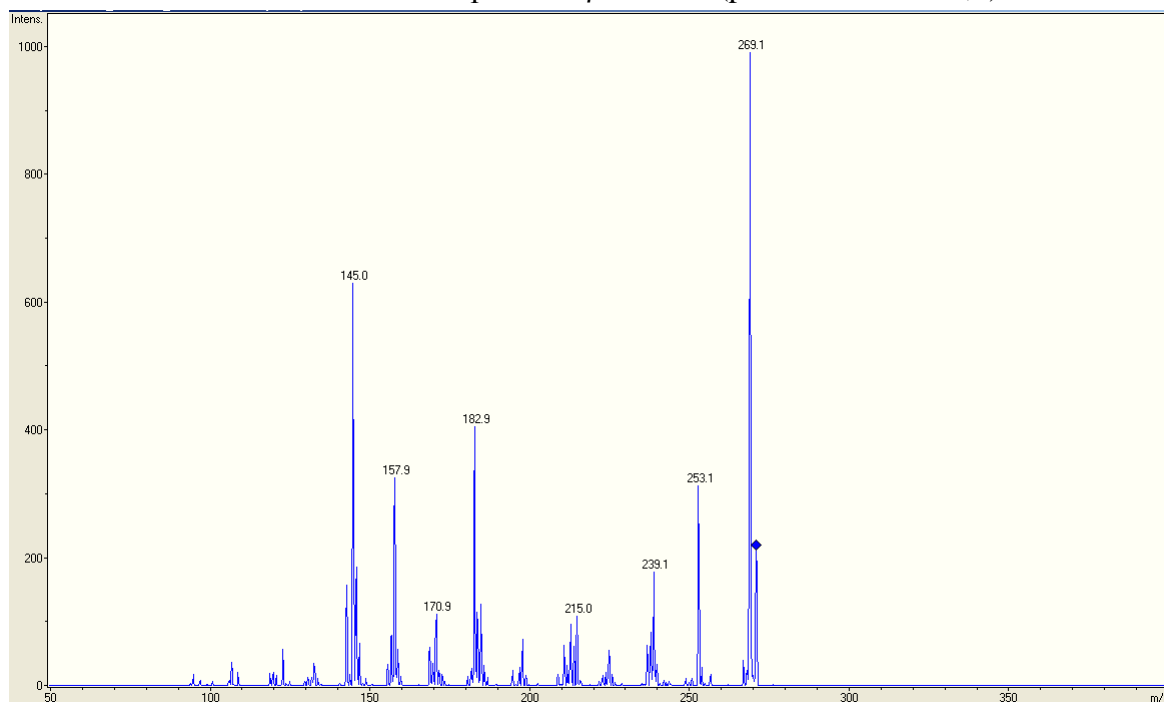
Příloha č. 6: Produktové hmotnostní spektrum estronu (prekurzor m/z 269,2)



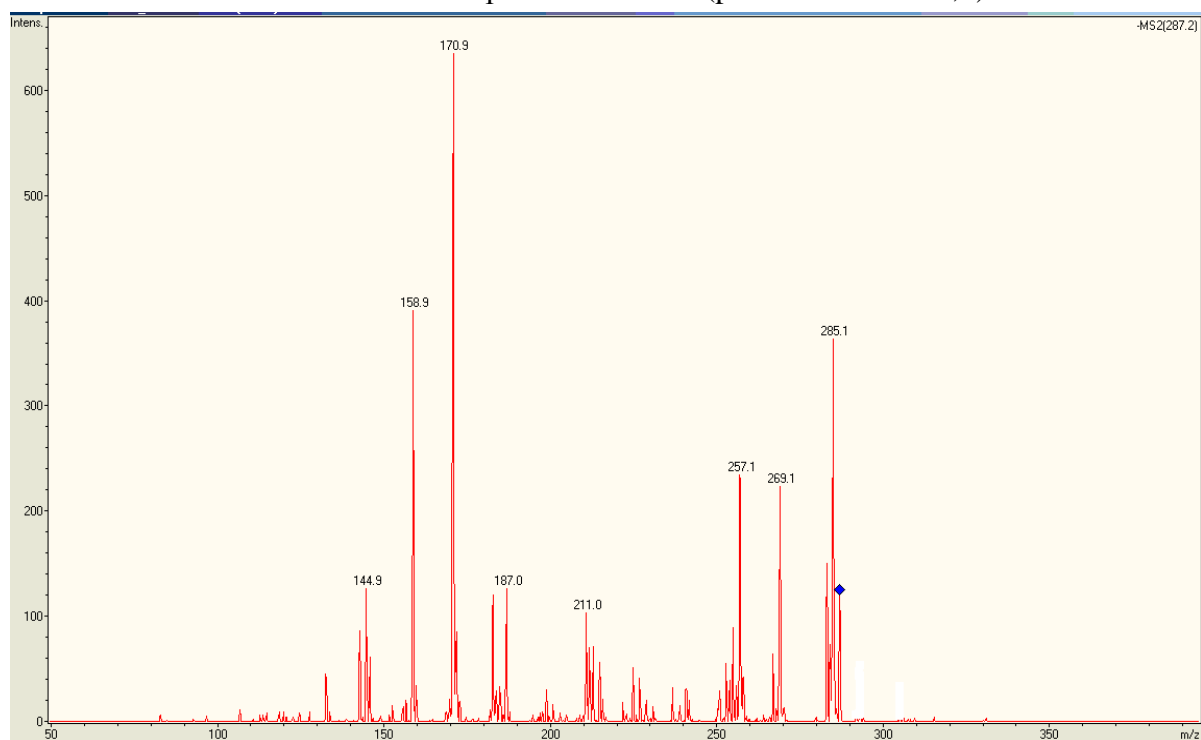
Příloha č. 7: Produktové hmotnostní spektrum  $\alpha$ -estriolu (prekurzor m/z 271,1)



Příloha č. 8: Produktové hmotnostní spektrum  $\beta$ -estriolu (prekurzor m/z 271,1)

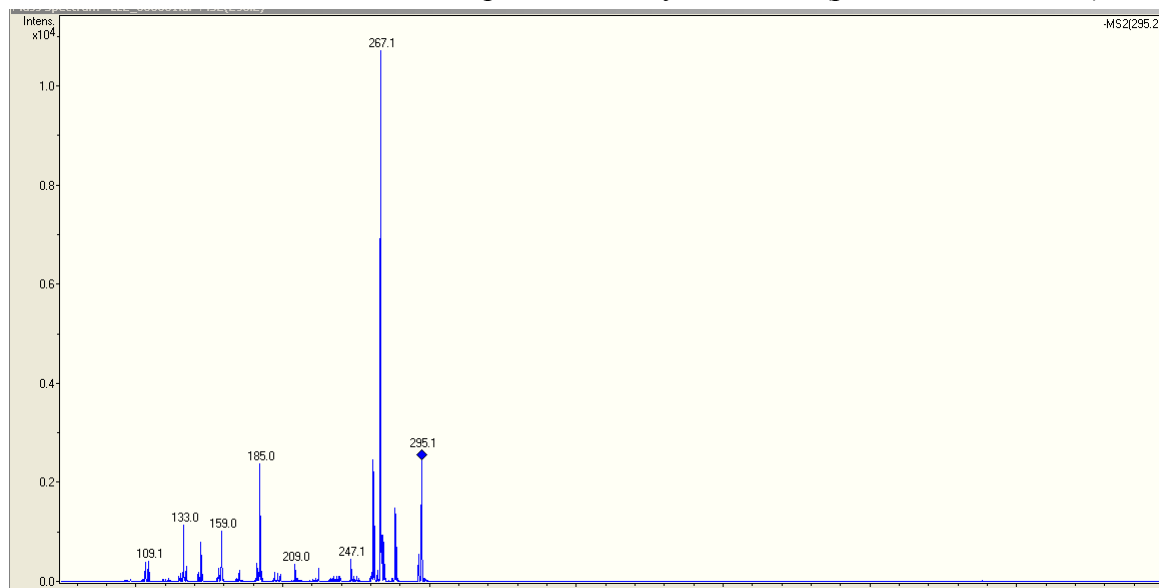


Příloha č. 9: Produktové hmotnostní spektrum estriolu (prekurzor m/z 287,2)

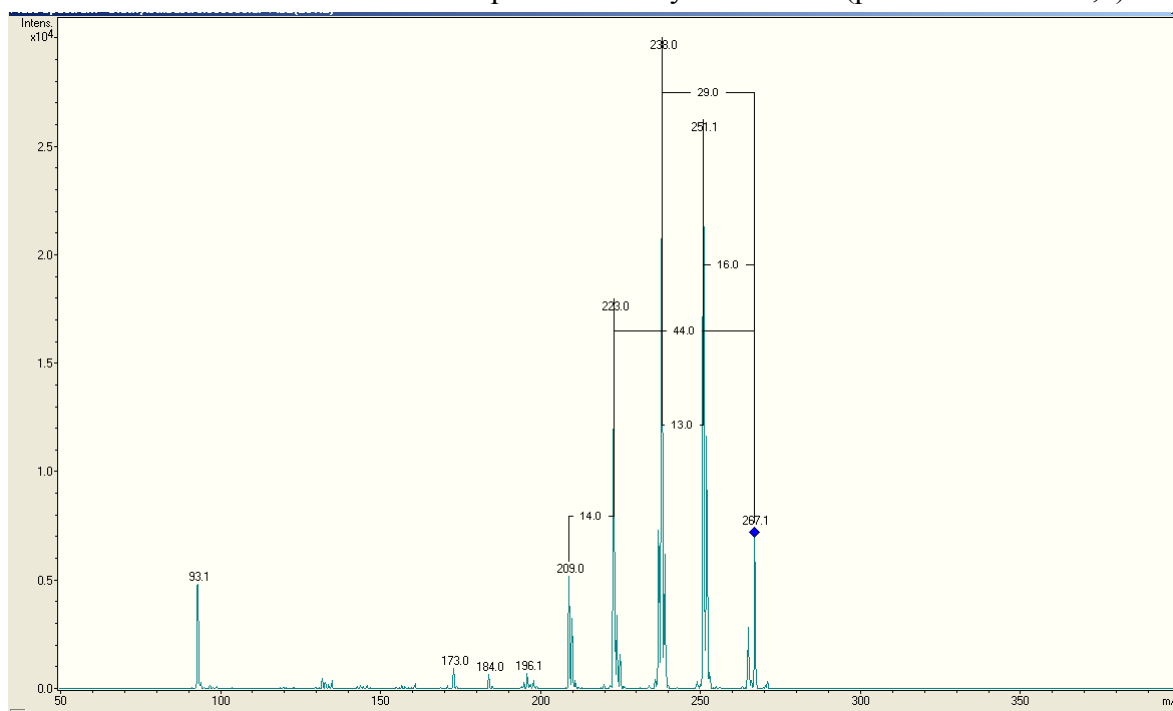




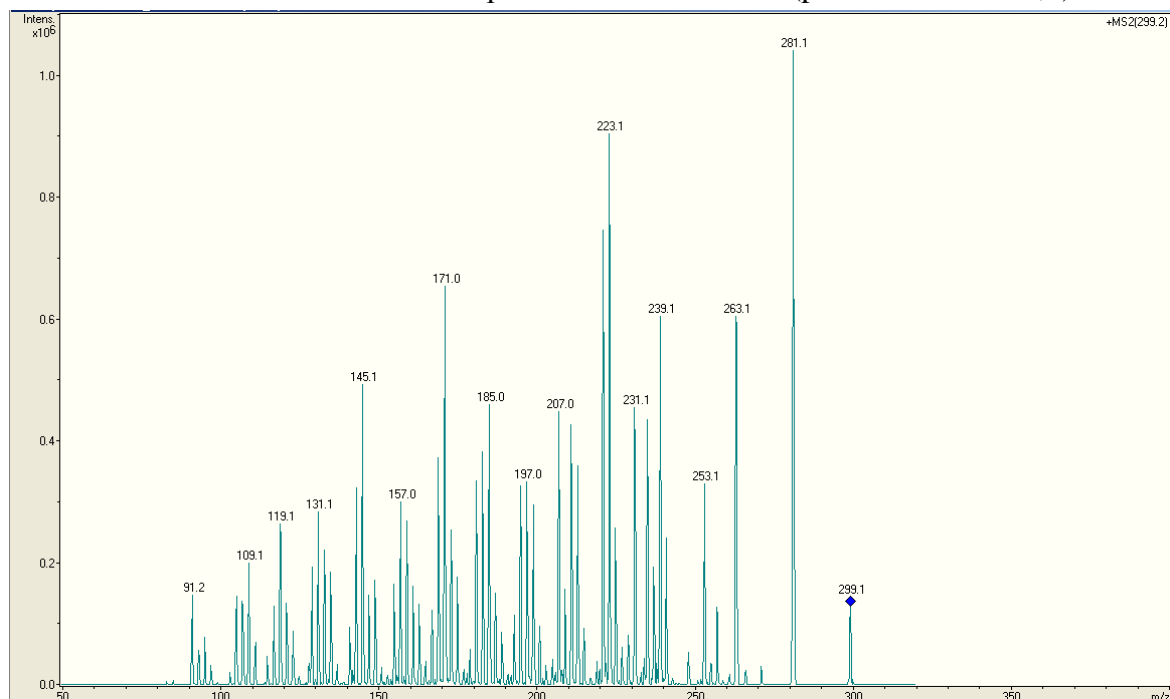
Příloha č. 10: Produktové hmotnostní spektrum ethinylestradiolu (prekurzor m/z 295,2)



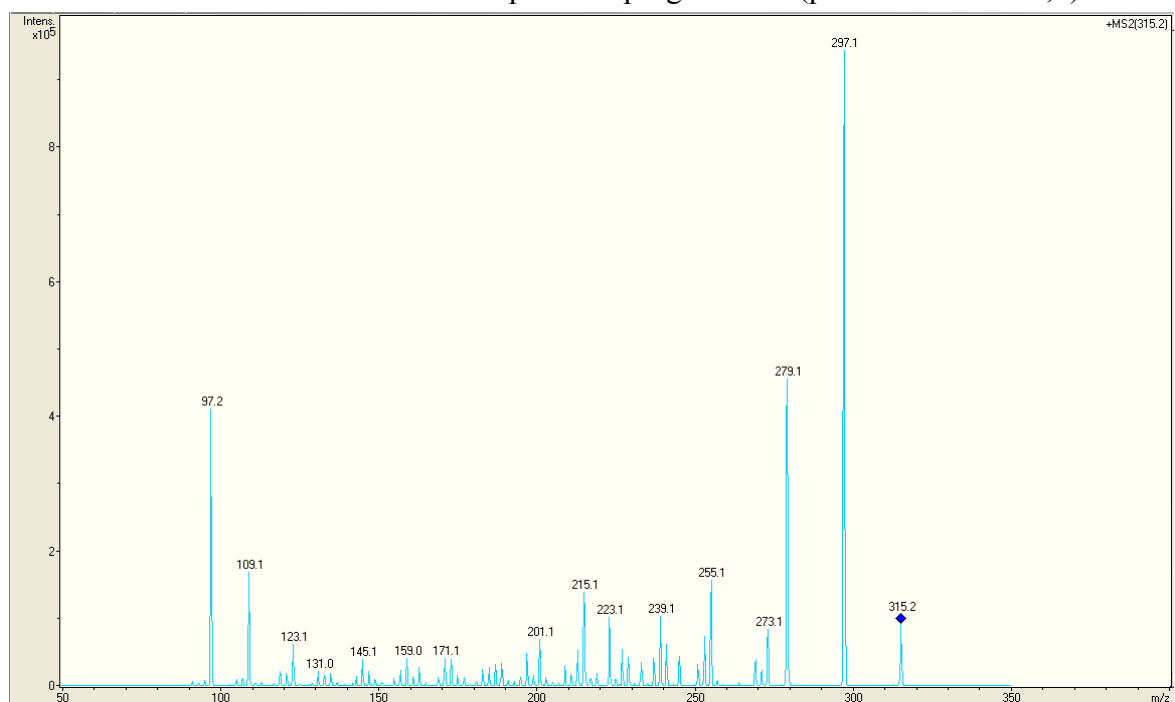
Příloha č. 11: Produktové hmotnostní spektrum diethylstilbestrolu (prekurzor m/z 267,1)



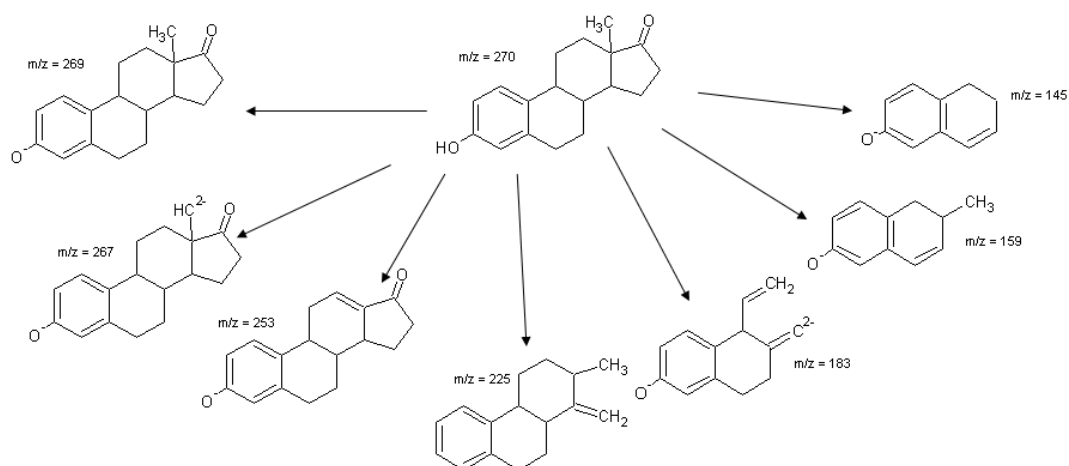
Příloha č. 12: Produktové hmotnostní spektrum norethindronu (prekurzor m/z 299,2)



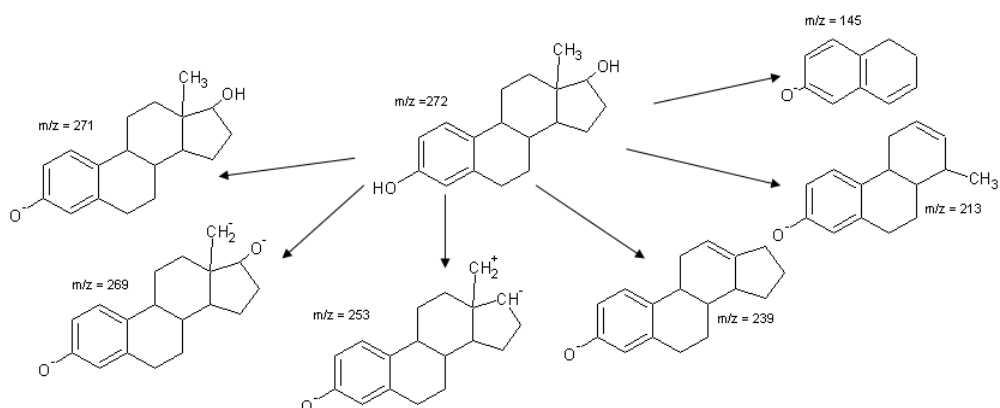
Příloha č. 13: Produktové hmotnostní spektrum progesteronu (prekurzor m/z 315,2)



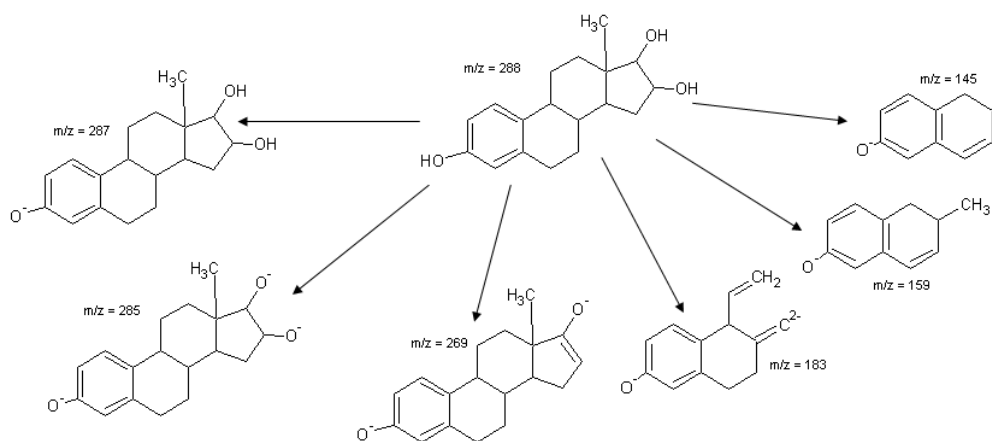
# Příloha č. 14: Fragmentační schémata Estron



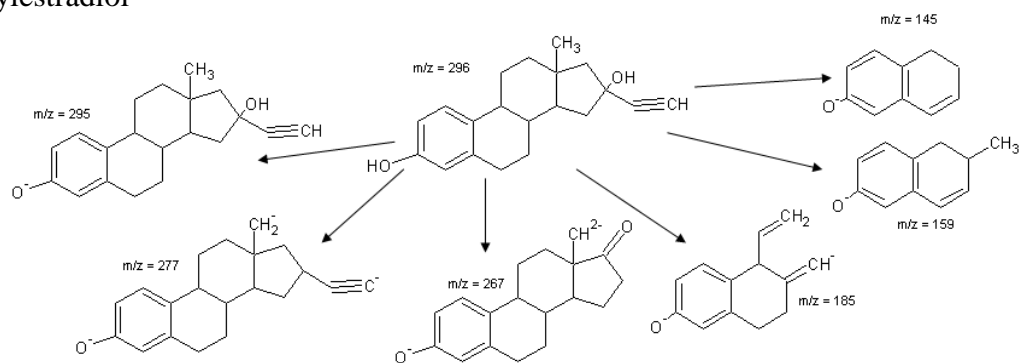
## Estradiol



## Estriol



## Ethinylestradiol



## Diethylstilbestrol

